

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DOS PARASITAS
GASTROINTESTINAIS, PULMONARES E HEMÁTICOS EM CÃES
NA CIDADE DO FUNCHAL, ILHA DA MADEIRA**

BETINA CATARINA GOUVEIA GOMES

ORIENTADORA:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2019

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DOS PARASITAS
GASTROINTESTINAIS, PULMONARES E HEMÁTICOS EM CÃES
NA CIDADE DO FUNCHAL, ILHA DA MADEIRA**

BETINA CATARINA GOUVEIA GOMES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Yolanda Maria Vaz

VOGAIS:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutor David Wilson Russo Ramilo

ORIENTADORA:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2019

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Betina Catarina Gouveia Gomes

Título da Tese ou Dissertação: Contribuição para o estudo dos parasitas gastrointestinais, pulmonares e hemáticos em cães na cidade do Funchal, Ilha da Madeira

Ano de conclusão: 2019

Designação do curso de Mestrado: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra:

- ☐ Clínica ☐ Produção Animal e Segurança Alimentar
☐ Morfologia e Função ☒ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto:

- ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 5 de Dezembro de 2019

Assinatura:

DECLARAÇÃO RELATIVA À ORTOGRAFIA EMPREGUE

Por escolha expressa da autora, não é utilizado o novo Acordo Ortográfico de 1990, ao abrigo dos Direitos de Autor, Decretos-Lei nº32/73, de 6 de Fevereiro, e nº 63/85, de 14 de Março.

“It was once thought that when a parasite had been identified, implicated as a cause of disease and its life cycle elucidated, its control or eradication would follow... Those who thought this seriously underestimated the complete hold a parasite has on its host and the intimacy of the relationship between them” – Cox (1993)

Agradecimentos

Começo por agradecer a quem tornou este estudo possível, a minha orientadora, Professora Doutora Isabel Maria Pereira da Fonseca, Professora Associada da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV-ULisboa); agradeço a disponibilidade, a infindável paciência e perseverança para comigo em todas as etapas desta dissertação, assim como durante o estágio no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV – ULisboa.

Agradeço à Dra. Lídia Gomes por todos os ensinamentos, por todas as horas dedicadas, pela sua praticidade e por extinguir as minhas dúvidas, sem esquecer a boa disposição característica do laboratório.

Agradeço à equipa da Vetmedis, em especial ao Dr. Duarte Correia e à Dr^a Joana Galiza que tão bem me receberam e fizeram sentir em casa. Que me proporcionaram um estágio em clínica fantástico, com uma casuísta fenomenal, que apostaram em mim e permitiram-me aprofundar conhecimentos e aumentar a minha segurança nesta vocação; vocês foram fenomenais! Agradeço ainda individualmente a cada elemento da Vetmedis, pois não me canso de elogiar esta equipa: obrigada às médicas veterinárias Dr^a Sofia Nóbrega, Dr^a Cristina Henriques, Dr^a Cláudia Melo e Sousa, e Dr^a Cristina Nóbrega; obrigada às enfermeiras veterinárias Carolina Calaça, Diana Soares e Patrícia Melim; e obrigada às auxiliares Sofia Ponte, Ana Luísa Cardoso, Maria José Mendonça e D^a Cidália Sousa. Agradeço também aos meus colegas de estágio, à Marisa Soares e ao João Silveira, e à voluntária Madalena Pereira (hoje em dia já mais perto de ser uma apaixonada colega de profissão), pois foram uma ajuda preciosa na recolha das amostras para este trabalho.

Agradeço à Sociedade Portuguesa dos Animais Domésticos (SPAD) e ao Canil do Vasco Gil pela disponibilidade imediata, e por me abrirem as suas portas para recolher as amostras necessárias para o estudo patente nesta dissertação. Agradeço ainda a todos os funcionários que disponibilizaram um pouco do seu tempo para me apoiar e guiar, assim como a ajuda preciosa dos seus patudos protegidos.

Agradeço ainda a todos os detentores e os seus patudos, que prontamente se disponibilizaram a contribuir para este estudo.

Agradeço a toda a minha família, Mãe, João, Pai, André, Avós, foram e são o meu suporte. Foi o vosso sacrifício que me permitiu chegar aqui. E para os bocadinhos que formam o meu coração e partiram antes de eu concluir esta jornada, obrigada por mostrarem um amor sem igual. É por vocês que aqui estou. Obrigada por todas as lambidelas e ronronares.

Agradeço a todos os amigos que a FMV proporcionou, foram sem dúvida das melhores prendas que a faculdade poderia dar. A lista é demasiado grande (e ainda bem) para o pequeno espaço nestes agradecimentos (levo-vos a todos comigo!). Faço apenas uma especial menção às BS's: obrigada por todas as horas de conversa, todas as horas de estudo e as de pouco estudo fora de horas, por todos os exames, trabalhos e projectos sem fim; e obrigada por todas as aventuras, as destes últimos anos e as que ainda virão.

Agradeço ainda ao HEV-FMV e a toda a sua equipa, em particular à Recepção, pois os anos a trabalhar no hospital em conciliação com o curso permitiram-me uma aprendizagem acelerada e uma experiência inigualável. Vocês permitiram-me crescer e ensinaram-me ferramentas fundamentais para o resto da minha vida profissional.

Por fim e numa repetição propositada, porque o destaque é necessário, agradeço a quem tornou este sonho possível, a quem proporcionou o impossível e a quem sempre acreditou em mim: obrigada Mãe.

Resumo

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DOS PARASITAS GASTROINTESTINAIS, PULMONARES E HEMÁTICOS EM CÃES NA CIDADE DO FUNCHAL, ILHA DA MADEIRA

O Homem e o cão partilham uma íntima ligação ao longo da história, com o cão a ser nomeado como o seu melhor amigo e a oferecer vários benefícios. No entanto esta relação próxima também representa um possível risco, uma vez que os cães abrigam diversos parasitas. As parasitoses e doenças caninas transmitidas por vectores (CVBD) possuem extrema importância, não só pelos seus efeitos na saúde dos animais, mas também para a saúde pública, dado o seu potencial zoonótico.

Elaborou-se um estudo observacional na população canina residente na cidade do Funchal, Ilha da Madeira (Portugal), de modo a contribuir para o conhecimento dos parasitas gastrointestinais, pulmonares e hemáticos numa população pouco estudada.

Recorreu-se a uma amostragem por conveniência com a recolha total de 136 amostras fecais e 59 amostras sanguíneas em dois grupos, um de cães com detentor (37 amostras fecais e 10 amostras sanguíneas) e um de cães residentes em associações e canis. Para este último, reuniu-se amostras na associação zoófila mais antiga da ilha, a Sociedade de Protecção dos Animais Domésticos (40 amostras fecais e 6 amostras sanguíneas), e no centro de recolha de animais oficial da cidade, o Canil do Vasco Gil (59 amostras fecais e 43 amostras sanguíneas).

Através de técnicas coprológicas qualitativas com observação dos parasitas ao microscópio, detectou-se uma prevalência de 19,9% de animais positivos, com infecções simples (14%) ou co-infecções (5,9%) pelas espécies de nematodes *Toxocara canis* (5,9%) e *Uncinaria stenocephala* (1,5%), e pelas espécies de protozoários *Cystoisospora* spp. (5,9%), *Cryptosporidium* spp. (2,9%) e *Giardia* spp. (9,6%). A prevalência detectada é pertinente para a Saúde Pública dado o potencial zoonótico de algumas das espécies observadas.

Nos hemoparasitas, através de técnicas morfológicas, como o esfregaço sanguíneo e técnica de Knott, detectaram-se 44,1% de animais positivos. Observou-se a presença do nemátode *Dirofilaria immitis* (1,7%) e das bactérias *Anaplasma phagocytophilum* (8,5%) e *Mycoplasma* spp. (37,3%). Através da técnica serológica IFI detectaram-se 73% de animais seropositivos, com anticorpos para o piroplasma *Babesia canis* (24,6%) e para as bactérias *Anaplasma phagocytophilum* (8,5%), *Ehrlichia canis* (5,1%) e *Rickettsia conorii* (54,2%). A prevalência elevada que se detectou carece de um estudo mais aprofundado de modo a caracterizar a endemicidade destes parasitas na área.

Palavras-chave: Parasita, Funchal, Cão, Gastrointestinal, CVBD

Abstract

CONTRIBUTION FOR THE STUDY OF GASTROINTESTINAL, PULMONAR AND BLOOD PARASITES IN DOGS FROM FUNCHAL CITY, MADEIRA ISLAND

Man and dog have shared an intimate bond throughout history, with dogs being stated as man's best friend and providing great benefits. Nevertheless, this close relationship also brings a potential risk, as dogs withhold many parasites. Parasitic diseases and canine vector borne diseases (CVBD) acquire great meaning, not only for dogs health but also for human health, as a variety of this parasites have a zoonotic risk.

This study aimed to contribute for the knowledge of the gastrointestinal, pulmonary and blood parasites in a canine population, about wich we don't have a deep knowledge, resident in Funchal city, Madeira Island (Portugal).

This study was made with a convenience sample, from the total collection of 136 fecal samples and 59 blood samples in two groups, one with owned dogs (37 fecal samples and 10 blood samples) and other from dogs living in a shelter. The samples for this last group came from the oldest animal aid association in the city, Sociedade Protectora dos Animais Domésticos (Domestic Animal Protector Society) (40 fecal samples and 6 blood samples) and from the official animal city rescue center, Canil do Vasco Gil (59 fecal samples and 43 blood samples).

Using qualitative coprological methods it was detected a prevalence of 19,9% of positive animals, with simple infections (14%) or mixed infections (5,9%), either with the nematodes *Toxocara canis* (5,9%) and *Uncinaria stenocephala* (1,5%), or with the protozoans *Cystoisospora* spp. (5,9%), *Cryptosporidium* spp. (2,9%) and *Giardia* spp. (9,6%). The prevalence found with this study brings a concern to public health, as some species found have zoonotic potential.

Regarding blood parasites and using morphological techniques, such as light microscope observation and Knott's test, it was found a total prevalence of 44,1% positive dogs. It was observed the nematode *Dirofilaria immitis* (1,7%) and the bacteria *Anaplasma phagocytophilum* (8,5%) and *Mycoplasma* spp. (37,3%). Resorting to the serologic technics, such as IFAT, it was found a total of 73% seropositive dogs, with antibodies for the piroplasm *Babesia canis* (24,6%) and for the bacteria *Anaplasma phagocytophilum* (8,5%), *Ehrlichia canis* (5,1%) and *Rickettsia conorii* (54,2%). The high prevalence showed requires a deeper analysis and study to determine the endemicity of this parasites in the area.

Key-words: Parasite, Funchal, Dog, Gastrointestinal, CVBD

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice.....	v
Índice de figuras	ix
Índice de gráficos.....	x
Índice de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas e símbolos	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO.....	2
2.1. Estágio extra-curricular – Clínica Vetmedis (actual Hospital Veterinário da Madeira).....	2
2.2. Recolha e processamento inicial das amostras.....	2
2.3. Estágio curricular – Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Parasitas gastrointestinais	4
3.1.1. Céstodes.....	4
3.1.1.1. <i>Dipylidium caninum</i>	4
3.1.1.2. <i>Echinococcus granulosus</i>	5
3.1.1.3. <i>Taenia</i> spp.	6
3.1.2. Nemátodes.....	7
3.1.2.1. <i>Ancylostoma caninum</i>	7
3.1.2.2. <i>Uncinaria stenocephala</i>	8
3.1.2.3. <i>Strongyloides stercoralis</i>	9
3.1.2.4. <i>Toxascaris leonina</i>	10
3.1.2.5. <i>Toxocara canis</i>	10
3.1.2.6. <i>Trichuris vulpis</i>	11
3.1.3. Protozoários.....	12
3.1.3.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.	12
3.1.3.2. <i>Cystoisospora</i> spp.....	13
3.1.3.3. <i>Giardia duodenalis</i>	14
3.2. Parasitas pulmonares.....	15
3.2.1. <i>Angiostrongylus vasorum</i>	16
3.3. Parasitas hemáticos	16
3.3.1. Helminthes transmitidos por vectores.....	17
3.3.1.1. <i>Dirofilaria immitis</i>	17

3.3.2.	Protozoários transmitidos por vectores	19
3.3.2.1.	<i>Babesia</i> spp.	20
3.3.2.2.	<i>Hepatozoon canis</i>	22
3.3.3.	Riquetsias transmitidas por vectores	23
3.3.3.1.	<i>Anaplasma</i> spp.	23
3.3.3.2.	<i>Ehrlichia canis</i>	24
3.3.3.3.	<i>Rickettsia conorii</i>	25
3.3.4.	Outras bactérias transmitidas por vectores	26
3.3.4.1.	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	26
4.	OBJECTIVOS	27
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1.	Caracterização da área geográfica em estudo	27
5.1.1.	Caracterização do clima	28
5.2.	Caracterização da população amostrada	28
5.2.1.	Sociedade Protectora dos Animais Domésticos (SPAD)	29
5.2.2.	Canil Municipal do Funchal (Canil do Vasco Gil - CVG)	30
5.3.	Inquérito realizado no grupo de cães com detentor aquando da recolha das amostras fecais	30
5.4.	Recolha, transporte e acondicionamento das amostras	30
5.5.	Técnicas Laboratoriais	31
5.5.1.	Técnicas utilizadas na análise das amostras fecais	31
5.5.1.1.	Técnica de Flutuação pelo Método de Willis	31
5.5.1.2.	Técnica de Sedimentação Natural	31
5.5.1.3.	Técnica de Baermann	32
5.5.1.4.	Esfregaço fecal corado pelo método de Zhiel-Neelsen modificado	32
5.5.2.	Técnicas utilizadas na análise das amostras sanguíneas	32
5.5.2.1.	Técnica de Knott modificada	33
5.5.2.2.	Esfregaço de sangue corado pelo método de Giemsa	33
5.5.2.3.	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , anti- <i>Babesia canis</i> , anti- <i>Ehrlichia canis</i> e anti- <i>Rickettsia conorii</i> pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI)	33
5.6.	Análise estatística	34
6.	RESULTADOS	35
6.1.	Resultados das Amostras Fecais	35
6.1.1.	Caracterização das amostras fecais e da população amostrada	35
6.1.1.1.	Caracterização da população de cães com detentor através dos resultados do inquérito realizado aquando da recolha das amostras fecais	35
6.1.2.	Resultados globais dos parasitas gastrointestinais	37
6.1.3.	Resultados por técnica coprológica	38
6.1.3.1.	Parasitas observados na técnica de flutuação pelo método de Willis	38

6.1.3.2.	Parasitas observados na técnica de sedimentação natural	38
6.1.3.3.	Parasitas observados na técnica de Baermann.....	39
6.1.3.4.	Parasitas observados no esfregaço fecal.....	39
6.1.4.	Resultados dos exames coprológicos por grupo de origem de recolha	39
6.1.4.1.	Grupo de cães com detentor.....	39
6.1.4.2.	Grupo de cães residentes em associações/canis.....	40
6.1.4.2.1.	Grupo de cães residentes na SPAD.....	40
6.1.4.2.2.	Grupo de cães residentes no CVG.....	41
6.1.5.	Resultados por parasita gastrointestinal.....	41
6.1.5.1.	Associações estatísticas – infecções por parasitas gastrointestinais e factores de risco.....	42
6.1.5.2.	Associações estatísticas entre os dados obtidos através dos inquéritos no grupo de cães com detentor e os resultados observados	43
6.2.	Resultados das Amostras Sanguíneas.....	43
6.2.1.	Caracterização das amostras sanguíneas e população amostrada.....	43
6.2.1.1.	Caracterização do grupo de cães com detentor	45
6.2.1.2.	Caracterização do grupo de cães residentes em associações e canis	45
6.2.1.2.1.	Caracterização do grupo de cães residente na SPAD.....	46
6.2.1.2.2.	Caracterização do grupo de cães residente no CVG.....	46
6.2.2.	Resultados globais dos parasitas hemáticos.....	46
6.2.2.1.	Parasitas observados por técnica laboratorial	47
6.2.2.1.1.	Parasitas observados pela técnica modificada de Knott.....	47
6.2.2.1.2.	Parasitas observados no esfregaço sanguíneo	47
6.2.2.1.3.	Resultados da técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI).....	47
6.2.2.2.	Resultados por grupo de origem de recolha.....	48
6.2.2.2.1.	Grupo de cães com detentor.....	48
6.2.2.2.2.	Grupo de cães residentes em associações/canis.....	48
6.2.2.2.2.1.	Grupo de cães residentes na SPAD.....	49
6.2.2.2.2.2.	Grupo de cães residentes no CVG.....	49
6.2.2.3.	Resultados por hemoparasitas.....	50
6.2.2.4.	Associações estatísticas – infecções por hemoparasitas e factores de risco ..	50
7.	DISCUSSÃO.....	51
7.1.	Discussão do estudo dos parasitas gastrointestinais.....	51
7.1.1.	Discussão sobre a caracterização das amostras fecais e população amostrada.....	51
7.1.2.	Discussão dos resultados dos parasitas gastrointestinais	52
7.1.3.	Discussão dos resultados por grupo de origem.....	56
7.1.3.1.	Discussão dos resultados na SPAD e no CVG.....	58
7.1.4.	Discussão das limitações do estudo de parasitas gastrointestinais	59
7.2.	Discussão do estudo dos parasitas hemáticos	60

7.2.1.	Discussão sobre a caracterização das amostras sanguíneas e população amostrada.....	60
7.2.2.	Discussão dos resultados dos hemoparasitas.....	61
7.2.3.	Discussão dos resultados por grupo de origem.....	64
7.2.3.1.	Discussão dos resultados na SPAD e no CVG.....	65
7.2.4.	Discussão das limitações do estudo de parasitas hemáticos	66
8.	CONCLUSÃO	67
9.	BIBLIOGRAFIA	68
10.	ANEXOS.....	77
10.1.	ANEXO 1 – Localização da cidade do Funchal, Ilha da Madeira, Portugal.....	77
10.2.	ANEXO 2 – Mapa das freguesias do Funchal com respectiva densidade populacional e distribuição das amostras recolhidas de cães (sanguíneas e fecais) (adaptado de CMF 2017).....	77
10.3.	ANEXO 3 – Localização SPAD e CVG.....	78
10.4.	ANEXO 4 – Inquérito realizado no grupo de cães com detentor durante a recolha das amostras fecais.....	79
10.5.	ANEXO 5 – Procedimento das técnicas laboratoriais.....	80
10.6.	ANEXO 6 – Distribuição das amostras fecais e resultados obtidos nas técnicas coprológicas (n=136)	86
10.7.	ANEXO 7 – Resultados obtidos nos inquéritos efectuados aos detentores aquando da recolha das amostras fecais (n=37)	93
10.8.	ANEXO 8 – Distribuição das infecções parasitárias gastrointestinais por grupo de origem (com detentor vs residentes associações/canis) (n=136).....	97
10.9.	ANEXO 9 – Associações estatísticas entre os dados obtidos através dos inquéritos no grupo de cães com detentor e os resultados de parasitas gastrointestinais observados (n=37).....	98
10.10.	ANEXO 10 – Distribuição das amostras sanguíneas e caracterização dos animais (n=59).....	99
10.11.	ANEXO 11 - Resultados obtidos nas amostras sanguíneas através das técnicas morfológicas e serológicas (n=59)	102
10.12.	ANEXO 12 – Distribuição das infecções parasitárias hemáticas por grupo de origem e local de recolha (n=59).....	105
10.13.	ANEXO 13 – Associações estatísticas entre as características observadas e os resultados de hemoparasitas detectados (n=59)	106

Índice de figuras

Figura 1 - Ovo de <i>Uncinaria stenocephala</i> (original)	8
Figura 2 - Ovo de <i>Toxocara canis</i> (original)	11
Figura 3 e 4 - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em esfregaços fecais corados pelo método Zhiel-Neelsen (original)	13
Figura 5 - Oocistos de <i>Cystoisospora</i> spp. (original).....	14
Figura 6 - Quistos de <i>Giardia</i> spp. em esfregaço fecal corado pelo método de Zhiel-Neelsen (original).....	14
Figura 7 - Microfilária em esfregaço de sangue corado pelo método de Giemsa (original)..	18
Figura 8 - Microfilária de <i>Dirofilaria immitis</i> obtida pela técnica de Knott (original).....	18
Figura 9 - Ovo de <i>Uncinaria stenocephala</i> (original).....	38
Figura 10 - Resultado de <i>Ehrlichia canis</i> obtido por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (original).....	48
Figura 11 - Resultado de <i>Ehrlichia canis</i> obtido por IFI, evidenciando o aspecto do controlo negativo (original).....	48
Figura 12 - Resultado de <i>Ehrlichia canis</i> obtido por IFI, evidenciando o aspecto de uma amostra positiva (original).....	48

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das amostras fecais por grupo de origem e local de recolha (n=136)	35
Gráfico 2 - Distribuição dos cães com detentor por freguesia de residência (n=37)	35
Gráfico 3 - Distribuição dos cães com detentor por grupo etário (n=37)	36
Gráfico 4 - Distribuição dos cães com detentor por sexo (n=37)	36
Gráfico 5 - Distribuição dos cães com detentor de acordo com os hábitos de desparasitação externa e interna (n=37)	36
Gráfico 6 - Distribuição dos cães com detentor e co-habitação interespécie (n=37)	37
Gráfico 7 - Distribuição dos cães com detentor e co-habitação intra-espécie (n=37)	37
Gráfico 8 - Prevalência global das infecções por parasitas gastrointestinais (n=136)	37
Gráfico 9 - Prevalência das infecções gastrointestinais nos cães com detentor (n=37)	39
Gráfico 10 - Distribuição das infecções simples e co-infecções e tipo de parasita observado no grupo de cães com detentor (n=10)	39
Gráfico 11 - Prevalência das infecções gastrointestinais nos cães residentes em associações/canis (n=99)	40
Gráfico 12 - Distribuição das amostras sanguíneas por grupo de origem e local de recolha (n=59)	44
Gráfico 13 - Distribuição dos cães por faixa etária (n=59)	44
Gráfico 14 - Distribuição dos cães amostrados por sexo (n=59)	44
Gráfico 15 - Hábitos de profilaxia endoparasitocida (n=59)	45
Gráfico 16 - Prevalência dos hemoparasitas observados por técnicas morfológicas (n=59)	46
Gráfico 17 - Seroprevalência dos hemoparasitas detectados por Imunofluorescência Indirecta (n=59)	46

Índice de tabelas

Tabela 1 - Potencial zoonótico dos principais parasitas gastrointestinais dos cães (Adaptado de Bowman (2014) e Nunes (2014)).....	4
Tabela 2 – <i>Taenia</i> spp. com os seus respectivos hospedeiros intermediários, metacéstodes, localização dos metacéstodes e período pré-patente (Adaptado de Taylor et al. (2016) e Braga (2017)).	6
Tabela 3 - Características morfológicas e morfométricas das microfilárias caninas (Adaptado de Magnis et al. (2013)).....	18
Tabela 4 - <i>Babesia</i> spp. com a sua distribuição, vector e virulência (Adaptado de Taylor et al. (2016))	20
Tabela 5 - Kits comerciais utilizados na técnica de IFI e respectivos limiares de positividade	34
Tabela 6 - Co-infecções observadas na pesquisa de parasitas gastrointestinais e respectiva frequência absoluta, prevalência e IC 95% (n=7)	38
Tabela 7 - Distribuição dos resultados dos parasitas gastrointestinais, com respectiva prevalência e significância, por grupo de origem e local de recolha (n=136)	42
Tabela 8 - Distribuição das infecções parasitárias gastrointestinais por local de recolha, dentro do grupo de residentes em associações/canis (n=99)	42
Tabela 9 - Distribuição das amostras por freguesia de residência com respectiva prevalência parasitária e IC 95% (n=136).....	43
Tabela 10 - Co-infecções observadas na detecção de anticorpos anti-hemoparasitas através da técnica IFI e frequência absoluta de animais co-infectados (n=7).....	47
Tabela 11 - Distribuição dos resultados dos hemoparasitas observados e anticorpos detectados, por grupo de origem e local de recolha, com respectivas associações estatísticas (n=59)	51

Lista de abreviaturas e símbolos

% – Percentagem

® – Marca Registada

μl – Microlitro

μm – Micrómetro

Ac – Anticorpo (s)

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

CVG – Canil do Vasco Gil / Canil Municipal do Funchal

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético, do inglês *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FMV-ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

g – Grama

hab – Habitantes

HD – Hospedeiro Definitivo

HI – Hospedeiro Intermediário

HP – Hospedeiro Paraténico

IC – Intervalo de Confiança

IFI – Imunofluorescência indirecta

IgG – Imunoglobulina G

km² – Quilómetro quadrado

L1 – Larva estado 1

L2 – Larva estado 2

L3 – Larva estado 3

m² – Metro quadrado

ml – Mililitro

MOC – Microscópio Óptico Composto

n – Número

NUTS – Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

°C – Graus Celsius

p – Nível de significância

PBS – Solução Tampão Fosfato-salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PP – Período Patente

PPP – Período Pré-patente

rADN – Ácido desoxirribonucleico ribossómico

SPAD – Sociedade Protectora dos Animais Domésticos

spp. – Espécies

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization*

WSPA – Sociedade Mundial de Protecção Animal, do inglês *World Society for the Protection of Animals*

χ^2 – Teste Qui-quadrado de Pearson

1. INTRODUÇÃO

A relação entre o Homem e os animais é tão antiga quanto a origem do Homem, sendo o cão um dos favoritos (Merlo et al. 2007). Os cães e a sua relação próxima com os humanos promovem muitos benefícios, quer físicos e sociais, como emocionais (Dohoo et al. 1998; Robertson et al. 2000). Contudo, apesar dos benefícios, esta relação próxima também representa um possível risco para a saúde pública, uma vez que os cães abrigam diversos parasitas (Robertson et al. 2000; Martínez-Moreno et al. 2007); assim as parasitoses e doenças transmitidas por vectores são de extrema importância, não só pelos seus efeitos na saúde dos animais, mas também para a saúde pública, dado o seu possível potencial zoonótico (Eguía-Aguillar et al. 2005). As parasitoses são ainda doenças em constante evolução, não só devido às novas descobertas clínicas, mas também devido à expansão a áreas geográficas anteriormente não afectadas ou com dados epidemiológicos pouco conhecidos (Moura 2016).

A investigação na Medicina Veterinária possui um papel crucial na redução do risco das doenças zoonóticas (Dohoo et al. 1998); por isso, torna-se imperioso a actualização de conhecimentos nesta área, através de novos dados de prevalência e ao conhecimento de novas medidas de controlo (Moura 2016). Com este mote surge o principal objectivo desta dissertação: contribuir com novos dados de prevalência dos parasitas presentes em cães na cidade do Funchal.

Na Ilha da Madeira, mais concretamente na cidade do Funchal, os estudos realizados em animais de companhia são escassos, apesar da estimativa de 11 000 a 18 000 cães a residir nesta área. Estudos prévios debruçaram-se sobre a presença de ixodídeos (Almeida 1997), vários analisaram a prevalência de *Dirofilaria immitis* na ilha (Gomes 2009; Pereira 2010; Alho 2017; Cardoso 2019) e ainda Cardoso et al. (2012) estudaram, além da seroprevalência de *D. immitis*, a seroprevalência de *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. e *Leishmania infantum* (este tratou-se de estudo nacional com uma amostra de 10 cães a representar a ilha da Madeira). Até à data, e do conhecimento da autora, estes são os estudos no âmbito da parasitologia e relacionados com a população canina disponíveis, reforçando a necessidade de mais estudos e de actualização de dados.

Esta dissertação inicia-se com um resumo dos estágios efectuados pela aluna e é seguida de uma breve revisão bibliográfica dos parasitas gastrointestinais, pulmonares e hemáticos mais importantes nos cães. A revisão bibliográfica foi seleccionada de acordo com os parasitas esperados numa população canina portuguesa. Posteriormente na dissertação são definidos os objectivos para o estudo de campo, os materiais e métodos aplicados com a caracterização do local e população em estudo, e ainda as técnicas e os inquéritos realizados. Segue-se a apresentação dos resultados do estudo com posterior discussão e considerações finais.

2. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

O estágio da aluna compreendeu três períodos distintos, iniciando-se com um estágio extra-curricular em ambiente clínico, na Clínica Vetmedis, sucedido por um período de recolha e processamento das amostras necessárias para elaboração do estudo apresentado nesta dissertação e posteriormente pelo estágio curricular no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa).

2.1. Estágio extra-curricular – Clínica Vetmedis (actual Hospital Veterinário da Madeira)

Este estágio decorreu entre 1 de Outubro de 2015 e 31 de Dezembro de 2015, com um total de 600 horas. No ambiente clínico a aluna teve oportunidade de acompanhar consultas de rotina, de urgências e ao domicílio, aprendendo as dificuldades e como contornar as mesmas. No acompanhamento das consultas, sob orientação médico-veterinária, a aluna realizou anamneses, exames do estado geral, administrou medicação oral e injectável, procedeu à limpeza de feridas e realização de pensos. Ainda em consulta, a aluna pôde promover a educação dos detentores para actos de vacinação e desparasitação. Após cada consulta, a aluna debateu com o médico veterinário assistente os casos clínicos, incidindo nos diagnósticos diferenciais e respectiva terapêutica. A aluna assistiu e realizou exames complementares de diagnóstico, como análises clínicas, hematológicas e bioquímicas, através de equipamento para contagem celular e de bioquímica seca respectivamente, observou gotas de sangue a fresco para pesquisa de microfilárias, procedeu à coloração de lâminas de esfregaços de sangue e citologias recorrendo à técnica Diff-Quick para posterior análise ao microscópio óptico, efectuou análises de urina, e ainda realizou e observou raspagens de pele e colheitas de pêlo para identificação de ectoparasitas e pesquisa de dermatófitos, através de meios de cultura. A aluna auxiliou na realização de radiografias digitais e ecografias, tendo a oportunidade de assistir a várias ecocardiografias. No departamento do internamento a aluna monitorizou os pacientes, colocou cateteres, preparou e administrou medicação oral e injectável. No âmbito da cirurgia a aluna participou na preparação do paciente e na decisão do plano anestésico mais adequado, continuando na monitorização anestésica e posteriormente como ajudante do cirurgião, auxiliando em pequenas cirurgias electivas, como ovário-histerectomias e orquiectomias.

Durante este estágio a aluna beneficiou ainda de duas formações, oferecidas ao corpo clínico, com a duração total de 6 horas, na área de anestesiologia e oncologia.

2.2. Recolha e processamento inicial das amostras

As amostras necessárias para elaboração do estudo foram recolhidas no período de 16 de Dezembro de 2015 e 27 de Abril de 2016, na Sociedade Protectora dos Animais (SPAD),

no Canil Municipal do Funchal (Canil Municipal do Vasco Gil - CVG) e através da clínica Vetmedis e detentores particulares. A recolha das amostras foi realizada pela aluna e por colegas estagiários dispostos a contribuir para esse estudo. O processamento decorreu entre Janeiro de 2016 e Abril de 2016, no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-Ulisboa. O processo de recolha, transporte e análise das amostras sanguíneas e fecais envolveu cerca de 400 horas no total.

2.3. Estágio curricular – Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa

A aluna realizou o estágio curricular entre 6 de Março de 2017 e 31 de Agosto de 2017, num total de 850 horas, sob a supervisão da sua orientadora, a Prof. Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio, e da Dr^a Lídia Gomes.

No estágio a aluna acompanhou o quotidiano do laboratório e participou em todas as actividades, desde a recepção, identificação e preparação de amostras, à análise e correcto armazenamento das mesmas. Foi possível à aluna não só observar as amostras que deram entrada no laboratório, mas também as amostras de outros estudos a decorrer, aumentando fortemente a observação de diferentes parasitas, desde parasitas de cães, vacas, cavalos e até de lobos, lamas e quatis. A aluna processou e analisou amostras fecais, recorrendo a técnicas coprológicas qualitativas, como a Técnica de Flutuação pelo Método de Willis e Técnica de Sedimentação Natural para pesquisa de ovos de helmintes, assim como técnicas coprológicas quantitativas, como a contagem de ovos com a Câmara de McMaster. Realizou ainda a Técnica de Baermann para pesquisa de larvas L1 de nemátodes respiratórios, e procedeu à preparação e observação de esfregaços fecais, para posterior pesquisa de protozoários. Na coloração dos esfregaços aprendeu e aplicou o método de Ziehl-Neelsen modificado. Em amostras de sangue a aluna realizou e observou esfregaços para a pesquisa de hemoparasitas, realizou a Técnica de Knott modificada para pesquisa de microfilárias e acompanhou a realização de testes serológicos, como o teste Leiscan® *Leishmania* ELISA Test para a detecção e medição semi-quantitativa de anticorpos anti-*Leishmania* em soro de cão. A aluna participou, de acordo com as amostras recebidas pelo laboratório (raspagens de pele, amostras de pêlo ou apenas o envio do parasita), na preparação, observação e identificação de ectoparasitas, como carraças, pulgas, piolhos e ácaros.

Durante o estágio foi possível a apresentação do projecto de tese de mestrado da aluna aos seus colegas do 2º ano, no âmbito da disciplina de Actividades Complementares III. Através desta exposição a aluna apresentou os benefícios de realizar um projecto de investigação como dissertação de mestrado e evidenciou a contribuição que cada um pode dar para a ciência ao investigar um tema pouco estudado ou ao contribuir com novos dados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Parasitas gastrointestinais

Os cães são frequentemente infectados com parasitas gastrointestinais, sendo que no contexto Europeu e nacional os mais comuns são: os céstodes *Dipylidium caninum*, *Echinococcus* spp. e *Taenia* spp.; os nemátodes *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Trichuris vulpis* e *Uncinaria stenocephala* (ESCCAP 2017); e os protozoários *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Cystoisospora* spp. (Palmer et al. 2008; Khante et al. 2009). Estes parasitas representam um problema para a saúde animal e alguns ainda exibem potencial zoonótico (Tabela 1), revelando-se um possível risco para a saúde pública (Robertson et al 2000; Martínez-Moreno et al. 2007).

Tabela 1 - Potencial zoonótico dos principais parasitas gastrointestinais dos cães (Adaptado de Bowman (2014) e Nunes (2014))

	Parasita	Potencial Zoonótico
Céstodes	<i>Dipylidium caninum</i>	Dipilidiose
	<i>Taenia</i> spp.	Cenurose (raro)
	<i>Echinococcus</i> spp.	Hidatidose
Nemátodes	<i>Ancylostoma caninum</i>	Larva migrante cutânea Enterite eosinofílica
	<i>Uncinaria stenocephala</i>	Larva migrante cutânea
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Estrongiloidose
	<i>Toxascaris leonina</i>	Larva migrante visceral (raro)
	<i>Toxocara canis</i>	Larva migrante visceral Larva migrante ocular
	<i>Trichuris vulpis</i>	Tricuriose (raro)
	<i>Cystoisospora</i> spp.	-
Protozoários	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Criptosporidiose
	<i>Giardia duodenalis</i>	Giardiose

3.1.1. Céstodes

A esta classe pertencem as espécies *Dipylidium caninum*, *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, e o género *Taenia*, frequentes no cão (Palmer et al. 2008; Khante et al. 2009). Nesta dissertação, dentro do género *Echinococcus*, apenas focaremos a espécie *E. granulosus*, dado possuir maior relevância para os cães (ESCCAP 2017). Na classe dos céstodes há ainda um outro parasita reportado na Europa e que afecta os cães, o género *Mesocestoides*, mas uma vez que não provoca sinais clínicos e detêm uma menor importância na Medicina Veterinária (Taylor et al. 2016; ESCCAP 2017) não será abordado de forma detalhada; este género tem distribuição mundial, parasita o intestino delgado dos carnívoros e apesar de ter potencial zoonótico, as infecções em humanos são raras (Bowman 2014).

3.1.1.1. *Dipylidium caninum*

Os adultos de *Dipylidium caninum* atingem entre 15 a 75 cm e têm como hospedeiros definitivos (HD) os cães, gatos e raposas. Apresentam uma distribuição mundial e encontram-se por toda a Europa (Bowman 2014; ESCCAP 2017). O ciclo de vida é heteroxeno e o HD

adquire o parasita, quando ingere as pulgas (*Ctenocephalides* spp.) ou piolhos (*Trichodectes canis*) infectados com as larvas cisticercóides de *D. caninum* (Bowman 2014). O período pré-patente (PPP) de infecção é de 21 dias, neste período o parasita desenvolve-se de larva cisticercóide até adulto, com os ovos a serem expelidos pelos segmentos grávidos. O período patente (PP) (período em que se observa o parasita, os seus ovos ou larvas) é de vários meses (ESCCAP 2017).

Na maioria das vezes a infecção é assintomática, mas pode provocar prurido anal (ESCCAP 2017), enterite crónica, vômito e, raramente, alterações neurológicas (Foreyt 2001). O diagnóstico é realizado pela observação dos proglótes nas fezes (assemelhando-se a bagos de arroz) ou observação dos ovos através de técnicas coprológicas qualitativas, como a técnica de flutuação pelo método de Willis (Foreyt 2001). Os ovos são mantidos em cápsulas ovíferas com uma dimensão de 200 µm por 150 µm, cada uma organizada com 20 ou mais ovos no seu interior (Taylor et al. 2016).

Uma vez detectado a presença do parasita, deve-se instituir terapêutica anti-helmíntica, como o praziquantel ou epsiprantel (ESCCAP 2017). Para o controlo de *D. caninum* é fundamental o controlo dos HI; para evitar as novas infecções deve-se realizar um controlo ambiental e um controlo insecticida nos cães (ESCCAP 2018a).

Apresenta potencial zoonótico e ocasionalmente infecta crianças, quando estas acidentalmente ingerem pulgas/piolhos infectados com as larvas cisticercóides (Bowman 2014).

3.1.1.2. *Echinococcus granulosus*

Os adultos são pequenos (2 a 8 mm de comprimento) e alojam-se nos primeiros 20 cm do intestino delgado do HD (Foreyt 2001; Bowman 2014). O HD é o cão, mas também parasita outros animais; reconhece-se mais de 70 hospedeiros possíveis do parasita na fase larvar, alguns dos HI são os ungulados domésticos e silvestres, os leporídeos e o Homem (como hospedeiro acidental) (Bowman 2014). Esta espécie é cosmopolita e encontra-se difundida por toda a Europa, com uma elevada incidência em Portugal (Bowman 2014; Mateus 2015; ESCCAP 2017).

Os HI são infectados após a ingestão de ovos do parasita, na maioria dos casos, através de alimentos contaminados por fezes dos HD; os ovos são imediatamente infectantes após excreção nas fezes. Nos HI desenvolvem-se para a forma larvar, designada por *Echinococcus polymorphus*, que se aloja nas vísceras (quistos hidáticos uniloculares). Os HD infectam-se ao ingerir as vísceras dos HI parasitadas. Cada quisto hidático ingerido pode originar mais do que um parasita adulto. Os ovos podem permanecer viáveis até um ano, em condições apropriadas (Goldstein and Abrahamian 2017).

A infecção no HD é subclínica e raramente surge diarreia (ESCCAP 2017).

O diagnóstico é feito pela observação dos ovos, através da técnica de flutuação; observa-se um ovo com cerca de 30-35 µm, forma ovoide, com um embrião hexacanto no interior e uma parede espessa com estrias radiais. Os ovos dos géneros *Taenia* e *Echinococcus* são morfologicamente idênticos, assim através da observação ao microscópio óptico, apenas podemos identificá-los como ovos da família Taeniidae (Foreyt 2001). A diferenciação da espécie infectante é feita por métodos moleculares, como o PCR (ESCCAP 2017). Para o diagnóstico pode-se ainda utilizar os métodos serológicos, como a técnica de ELISA (Bowman 2014).

Todos os animais com suspeita de infecção por *E. granulosus* devem ser submetidos a terapêutica com anti-helmínticos, como o praziquantel ou o epsiprantel (ESCCAP 2017). A prevenção e educação dos detentores é importante no controlo desta infecção, sendo que a primeira linha de defesa passa por cuidados higiénicos rigorosos (Bowman 2014). Em zonas de elevada incidência os cães devem fazer tratamento farmacológico periódico e não devem ser alimentados com as vísceras dos HI (Foreyt 2001; ESCCAP 2017). Ainda, é indicado o controlo de animais errantes e a prevenção de abates ilegais de animais (HI) para consumo humano, pois estes, muitas vezes, são a fonte de contaminação dos cães (Bowman 2014).

Apresenta potencial zoonótico, provocando a Equinococose/Hidatidose no Homem, com vários casos a surgir em adultos e crianças em Portugal, especialmente na região do Alentejo (David de Moraes 2010). A ruptura de um quisto hidático pode resultar numa doença grave com reacção anafilática e risco de morte (Goldstein and Abrahamian 2017).

3.1.1.3. *Taenia* spp.

O género *Taenia* tem distribuição mundial e dentro deste, reconhecem-se cinco espécies cujo HD é o cão: *Taenia multiceps*, *T. hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* e *T. serialis* (Bowman 2014), os HI diferem consoante a espécie como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – *Taenia* spp. com os seus respectivos hospedeiros intermediários, metacéstodes, localização dos metacéstodes e período pré-patente (Adaptado de Taylor et al. (2016) e Braga (2017)).

Céstode	HI	Metacéstode	Localização metacéstode	PPP
<i>Taenia hydatigena</i>	Bovinos, ovinos, caprinos e suínos	Cisticerco <i>Cysticercus tenuicollis</i>	Cavidade abdominal, fígado	51 dias
<i>Taenia ovis</i>	Ovinos	Cisticerco <i>Cysticercus ovis</i>	Músculo	42 – 63 dias
<i>Taenia pisiformis</i>	Lagomorfos	Cisticerco <i>Cysticercus pisiformis</i>	Peritoneu, fígado	56 dias
<i>Taenia multiceps</i>	Ovinos, bovinos, caprinos, suínos, equinos, cervídeos e o Homem	Cenuro <i>Coenurus cerebralis</i>	Cérebro, medula	30 dias
<i>Taenia serialis</i>	Lagomorfos e o Homem	Cenuro <i>Coenurus serialis</i>	Tecido conjuntivo	30 – 60 dias

O ciclo de vida de *Taenia* spp. é heteroxeno e o HD infecta-se quando ingere as larvas estado 2 (L2 ou metacéstodes), presentes nas vísceras dos HI (Taylor et al. 2016). Os HI

infectam-se ao ingerir os ovos presentes em pastagens ou águas contaminadas pelas fezes dos HD. Consoante a espécie de *Taenia* o metacéstode pode assumir diferentes formas; nas espécies *T. hydatigena*, *T. ovis* e *T. pisiformis* apresenta a forma de cisticerco (uma vesícula com um escólex), e nas espécies *T. multiceps* e *T. serialis* apresenta a forma de cenuro (uma vesícula com vários escólices) (Tabela 2). O PPP é de 4 a 10 semanas e o PP é de vários meses a vários anos (ESCCAP 2017).

No HD, na maioria das vezes, a infecção por *Taenia* spp. é assintomática (ESCCAP 2017). No HI pode existir doença clínica com menor ou maior gravidade, consoante a localização dos metacéstodes e dimensão da infecção (Bowman 2014).

O diagnóstico é realizado pela identificação dos proglótes nas fezes ou dos ovos através da técnica de flutuação. Os ovos, com 32-38 µm, possuem um embrião hexacanto no interior e uma parede espessa com estrias radiais (Bowman 2014; Taylor et al. 2016).

Todos os cães em que sejam observados ovos ou proglotes devem ser tratados, com febendazol, praziquantel ou epsiprantel (Bowman 2014).

Das espécies infectantes do cão, *T. multiceps* e *T. serialis* são as que apresentam interesse zoonótico, uma vez que são capazes de infectar o Homem (Bowman 2014).

3.1.2. Nemátodes

Neste filo, as famílias mais importantes no contexto nacional e cujos parasitas adultos localizam-se no aparelho gastrointestinal do cão, são a Ancylostomatidae (com as espécies *Ancylostoma caninum* e *Uncinaria stenocephala*), Strongylidae (com a espécie *Strongyloides stercoralis*), Ascarididae (com as espécies *Toxocara canis* e *Toxascaris leonina*) e Trichuridae (com a espécie *Trichuris vulpis*) (ESCCAP 2017).

3.1.2.1. *Ancylostoma caninum*

Os ancilostomídeos são parasitas cosmopolitas largamente difundidos. A espécie *Ancylostoma caninum* é predominante no Sul da Europa, com casos esporádicos no Norte da Europa (ESCCAP 2017). Os adultos possuem 8 a 16 mm de comprimento e uma cápsula bucal com 3 pares de dentes afiados (Bowman 2014); alojam-se no intestino delgado e causam uma perda de sangue volumosa no hospedeiro (0,1 ml sangue/adulto/dia) (Jacobs et al. 2016). Os HD são os cães e canídeos silvestres (ESCCAP 2017).

Apresentam um ciclo de vida monoxeno e a infecção de um novo hospedeiro pode ocorrer de diversas formas: através da ingestão da larva (L3) presente no ambiente; por ingestão da larva presente no hospedeiro paraténico (HP); ou ainda a larva infectante pode penetrar por uma ferida na pele (Foreyt 2001; Bowman 2014); em cachorros pode ocorrer infecção por transmissão transmamária (ESCCAP 2017). O PPP é de 2 a 3 semanas e o PP pode ser prolongado consoante o sistema imunitário do hospedeiro (ESCCAP 2017).

A gravidade da infecção por ancilostomatídeos é influenciada pela idade e estado imunitário do hospedeiro; os cães à medida que crescem, tornam-se mais resistentes à infecção, quer tenham ou não contactado previamente com o parasita (Bowman 2014). Os sinais de infecção por *A. caninum* podem ser agudos ou crónicos e pode-se observar diarreia, hemorrágica ou não, perda de peso e anemia (ESCCAP 2017).

O diagnóstico é realizado por observação dos ovos através da técnica de flutuação (ESCCAP 2017). Os ovos excretados no ambiente têm uma dimensão de 40 por 60 µm e uma morfologia do tipo estrongilídeo, com uma forma ovóide, uma cápsula fina e um embrião no estado de mórula no seu interior (Foreyt 2001; Jacobs et al. 2016).

Os cães devem ser tratados com: fenbendazol/febantel, pamoato de pirantel, milbemicina oxima ou moxidectina (Bowman 2014; ESCCAP 2017). No ambiente, principalmente nos canis, deve ser efectuada uma desinfecção, por exemplo com hipoclorito de sódio a 1%, em conjunto com o tratamento dos animais infectados. É ainda fundamental as boas práticas de higiene, com a recolha periódica das fezes e a escolha de pavimentos adequados, não porosos, nos locais de permanência dos animais (Bowman 2014).

A espécie *A. caninum* tem potencial zoonótico. Provoca a larva migrante cutânea no Homem (Foreyt 2001) e enterite eosinofílica (Bowman 2014).

3.1.2.2. *Uncinaria stenocephala*

A presença desta espécie na Europa é predominantemente na zona central e norte do continente (ESCCAP 2017). Os adultos de *Uncinaria stenocephala* possuem entre 5 a 12 mm e apresentam placas cortantes na cápsula bucal (Bowman 2014; Foreyt 2001). Os adultos alojam-se no intestino delgado e alimentam-se em pequeno volume das proteínas plasmáticas do hospedeiro (Jacobs et al. 2016). Os HD são os canídeos e os felídeos (ESCCAP 2017).

A infecção do HD é semelhante à já descrita para a espécie *A. caninum*, da mesma família (Bowman 2014) no entanto para esta espécie não há transmissão transmamária (Jacobs et al. 2016). O PPP é de cerca de 3 a 4 semanas e o PP pode ser prolongado, consoante o estado imunitário do hospedeiro (ESCCAP 2017).

A infecção por *U. stenocephala* é menos patogénica que a infecção por *Ancylostoma* spp. uma vez que a espoliação é menor (Bowman 2014). Podemos observar enteropatia por perda de proteína, diarreia, perda de peso e anemia, sendo que os sinais apresentados podem ser agudos ou crónicos (Jacobs et al. 2016; ESCCAP 2017).

O diagnóstico é feito pela observação dos ovos através da técnica coprológica de flutuação (ESCCAP 2017); morfologicamente os ovos do género *Uncinaria* são



Figura 1 - Ovo de *Uncinaria stenocephala* (original)

semelhantes aos de *Ancylostoma*, mas de dimensão ligeiramente superior (75 µm por 45 µm) (Foreyt 2001).

Para o tratamento da infecção por *U. stenocephala* é aconselhado o uso de: fenbendazol, pamoato de pirantel, milbemicina oxima, moxidectina ou combinações comerciais com estas substâncias (Bowman 2014).

Estão reportados casos acidentais e esporádicos de infecções por *U. stenocephala* em humanos (Bowman 2014).

3.1.2.3. *Strongyloides stercoralis*

O nematode *Strongyloides stercoralis* encontra-se distribuído por todo o mundo, mas a sua prevalência é subestimada, dado a maioria das infecções ser subclínica (Aung et al. 2018). Infectam os cães, os felinos e o Homem (Bowman 2014). Os parasitas do género *Strongyloides* apresentam dualidade biológica, ou seja, com gerações de vida livre e outras de vida parasitária (Bowman 2014). Os machos e fêmeas de vida livre são pequenos, com cerca de 0,7 mm, os adultos de vida parasitária alojam-se no intestino delgado e atingem cerca de 2,2 mm (Foreyt 2001).

Apresentam um ciclo monoxeno, em que o HD infecta-se através da ingestão das larvas de estado 3 (L3) ou através da entrada destas por via cutânea com posterior migração até ao intestino delgado, onde ocorrem as mudas e maturação para adulto. No HD ocorre reprodução assexuada, em que os ovos, com 30 por 55 µm, eclodem dentro do hospedeiro e as larvas de estado 1 (L1) são eliminadas para o ambiente. No ambiente sofrem duas mudas, até L3 infectante, voltando a parasitar um hospedeiro, ou sofrem quatro mudas, para larvas de vida livre. Nos adultos de vida livre ocorre reprodução sexuada. Supõe-se que a passagem entre gerações de vida livre e vida parasitária dependam das condições ambientais e existência de hospedeiros adequados. O PPP é de cerca de 15 dias (Bowman 2014). Não há transmissão transplacentária, mas há transmissão transmamária (Taylor et al. 2016). Nos cães imunossuprimidos as larvas infectantes (L3) podem penetrar a parede intestinal e re-invadir o hospedeiro (auto-infecção interna) ou ainda penetrar a pele na zona perianal (auto-infecção externa) (Bowman 2014).

A infecção por *S. stercoralis* pode originar diarreia grave, pneumonia e dermatite (Foreyt 2001; Bowman 2014). O diagnóstico pode ser feito através da técnica de flutuação pelo método de Willis, para observação dos ovos e larvas, no entanto as amostras têm de ser bastante recentes; ou através da técnica de Baermann para observação das larvas; ou ainda através de raspagens de pele quando se observa dermatite (Foreyt 2001).

O tratamento de *S. stercoralis* é difícil e deve ser feito com febendazol ou ivermectina (Bowman 2014; Taylor et al. 2016).

No Homem, estão relatadas diversas formas clínicas, variando desde pequenas infecções dérmicas, a alterações gastrointestinais crônicas e até o aparecimento de sinais neurológicos (ESCCAP 2017).

3.1.2.4. *Toxascaris leonina*

Os parasitas da espécie *Toxascaris leonina* são relativamente grandes, atingindo 3 a 10 cm, com um corpo branco-amarelado, uma extremidade anterior com asas cervicais lanceoladas e uma boca trilabiada. É uma espécie quase cosmopolita, distribuída por toda a Europa (ESCCAP 2017), mais observada em climas mais frios (Bowman 2014), cujos HD são os canídeos e felídeos. Possuem um ciclo de vida monoxeno e a infecção do HD ocorre por ingestão dos ovos embrionados presentes no solo ou através da ingestão das larvas presentes num HP. Os HP podem ser os roedores ou outros vertebrados, usualmente presas do HD (Bowman 2014). Os ovos eliminados no ambiente desenvolvem-se para o estado infectante em apenas uma semana (Bowman 2014). O PPP é de cerca de 8 semanas e o PP é de 4 a 6 meses (ESCCAP 2017).

A maioria das infecções são assintomáticas (ESCCAP 2017). Para o diagnóstico deve-se observar os ovos pela técnica de flutuação (ESCCAP 2017); estes são ovais, com uma parede externa espessa e lisa, e medem cerca de 75-85 µm (Foreyt 2001).

Todos os cães em que se detecte os ovos devem ser tratados com: fenbendazol, pamoato de pirantel, milbemicina oxima, ivermectina ou combinações comerciais com estas substâncias (Bowman 2014). São imprescindíveis medidas para eliminar ou diminuir a contaminação ambiental. Os solos onde os animais habitam devem permitir uma limpeza em profundidade e esta deve ser periódica, à base de água com pressão e desinfetantes como a lixívia. É fulcral a educação dos detentores para a necessidade de recolher as fezes dos animais no momento, antes do desenvolvimento dos ovos para a forma infectante (Foreyt 2001; Taylor et al. 2016).

O parasita *T. leonina* possui potencial zoonótico. Estão reportados casos de infecção em humanos, sendo que as crianças apresentam um risco maior de infecção (ESCCAP 2017). Pode provocar a larva migrante visceral, mas os casos são raros e esporádicos (Tekele 2003).

3.1.2.5. *Toxocara canis*

Apresenta distribuição mundial e encontra-se por toda a Europa (ESCCAP 2017), sendo que os carnívoros são os HD. Os adultos são grandes e esbranquiçados, atingem entre 10 a 15 cm e alojam-se no intestino delgado dos cães (Bowman 2014).

A infecção dos HD por *T. canis* pode ocorrer através de: ingestão dos ovos embrionados infectantes, no solo ou no pêlo; ingestão das larvas presentes no HP; por transmissão transmamária; ou por transmissão transplacentária (Bowman 2014). Os ovos embrionados após serem ingeridos pelo hospedeiro, eclodem e as larvas penetram na parede

gastrointestinal, onde de seguida migram para diversos órgãos vitais, como o fígado, pulmões, coração e tecido muscular. Nestes as larvas podem enquistar e permanecer no estado infectante, ou após migrações complexas podem retornar ao lúmen intestinal e evoluir até a forma adulta, retomando o ciclo biológico. Os ovos eliminados desenvolvem-se até ao estado infectante em cerca de 4 semanas (Bowman 2014). O PPP varia consoante a origem da infecção, se a origem da infecção é pré-natal, é tipicamente 21 dias; se a origem da infecção foi através do leite o PPP é de 27 a 35 dias; e 32 a 39 dias após ingestão dos ovos embrionados. O PP é de 4 a 6 meses. (ESCCAP 2017).

Os sinais clínicos variam de assintomáticos, em hospedeiros com infecções com poucos parasitas, a caquexia e obstrução intestinal em animais com um grande parasitismo (ESCCAP 2017). A migração de *T. canis* pode provocar lesões nos órgãos vitais, como o fígado e pulmões, especialmente nos cachorros ou cães imunossuprimidos (Bowman 2014). Para o diagnóstico recorre-se à observação dos ovos pela técnica de flutuação; estes são grandes com 75-85 µm e uma parede externa espessa e rugosa (Bowman 2014).



Figura 2 - Ovo de *Toxocara canis* (original)

Todos os cães em que se detectem os ovos e cachorros com menos de 7 semanas de idade devem ser tratados com anti-helmínticos. O tratamento pode ser realizado com: febendazol (nas cadelas grávidas inicia-se a administração a partir do 40º dia de gestação até três dias pós-parto), pamoato de pirantel, milbemicina oxima, ivermectina ou combinações comerciais com estas substâncias (Bowman 2014). Para o controlo ambiental devem ser adoptadas as medidas anteriormente referidas para o controlo de *T. leonina*, com a correcta higienização do ambiente e educação dos detentores (Taylor et al. 2016).

Apresenta potencial zoonótico e as crianças possuem um maior risco de infecção, devido à ingestão accidental de solo contaminado com ovos. Nos humanos provoca a larva migrante visceral (ESCCAP 2017).

3.1.2.6. *Trichuris vulpis*

A espécie *Trichuris vulpis* está distribuída por diversas partes do mundo (Taylor et al. 2016) e por toda a Europa, onde predomina na região sul e centro (ESCCAP 2017). Uma característica importante é que os cães mais velhos tendem a ter uma maior carga parasitária do que os cães jovens (Taylor et al. 2016). Os adultos atingem 3 a 8 cm e alojam-se no ceco dos HD. Os HD são o cão, a raposa e o gato (Taylor et al. 2016). Apesar de raro, já foi reportado em humanos (Areekul et al. 2010; Traversa 2011).

O ciclo de vida de *T. vulpis* é monoxeno, com as fêmeas a excretar os ovos no ambiente, surgindo a L1 em um mês. O HD infecta-se ao ingerir os ovos embrionados (com a

L1) presentes no ambiente (Bowman 2014). O PPP é de 8 semanas e o PP pode chegar a 18 meses (ESCCAP 2017).

A infecção por *T. vulpis* é usualmente assintomática. Em casos com elevado número de parasitas pode-se observar uma colite hemorrágica, com anemia, diarreia e perda de peso (Taylor et al. 2016; ESCCAP 2017).

Para o diagnóstico deve-se observar os ovos de *T. vulpis*, através de técnicas coprológicas como a técnica de flutuação, ou observar os adultos (ESCCAP 2017). No entanto, uma vez que a eliminação dos ovos é parca e que frequentemente os sinais clínicos surgem antes do PPP, o diagnóstico é difícil, ocorrendo por vezes só na necrópsia ou através do sucesso da terapêutica implementada (Taylor et al. 2016). Os ovos são ovóides e bioperculados, lembrando o formato de um limão, com a dimensão de 75 por 40 µm; nas fezes, apresentam uma cor amarelo acastanhado (Foreyt 2001; Taylor et al. 2016).

Os cães infectados por *T. vulpis* devem ser tratados com: febendazol, febantel, milbemicina oxima ou moxidectina (Bowman 2014). Os ovos excretados no ambiente são resistentes e difíceis de eliminar, de modo que a desinfecção ambiental é importante, por exemplo com lixívia, esterilização por vapor de água e/ou luz do sol directa, para evitar re-infecções (Foreyt 2001).

3.1.3. Protozoários

Os protozoários são organismos unicelulares e microscópicos, pertencentes ao reino Protozoa; conhecem-se mais de 45 000 espécies e destas algumas são parasitas e outras simbioses (Bowman 2014). Nesta dissertação abordaremos de forma mais detalhada os géneros *Cryptosporidium* e *Cystoisospora*, e a espécie *Giardia duodenalis* dado a sua importância na Saúde Pública e Veterinária (ESCCAP 2018a) e tendo em conta a orientação prática desta dissertação.

3.1.3.1. *Cryptosporidium* spp.

Os parasitas deste género são pequenos e infectam a bordura em escova do epitélio gastrointestinal (Taylor et al. 2016). Em cães foram reportadas as espécies *Cryptosporidium canis* e *Cryptosporidium parvum*. Esta última espécie infecta maioritariamente vitelos, mas tem uma baixa especificidade por hospedeiro e assim é capaz de infectar outros mamíferos, como os ungulados domésticos e silvestres, o cão e o Homem (é a espécie mais comum no Homem e entre estudantes veterinários) (Bowman 2014; Taylor et al. 2016). A espécie *C. canis* infecta o cão e o Homem (especialmente humanos imunocomprometidos) (Bowman 2014; ESCCAP 2018a). O género *Cryptosporidium* apresenta uma distribuição mundial, mas uma vez que a diferenciação da espécie infectante depende de análise molecular, a distribuição por espécie exacta, entre cães, é desconhecida (ESCCAP 2018a).

O ciclo de vida é monoxeno sendo algumas espécies capazes de infectar vários hospedeiros vertebrados. Os oocistos infectantes com quatro esporozoítos são libertados nas fezes e permanecem viáveis no ambiente durante meses. A infecção de um novo hospedeiro ocorre por transmissão fecal-oral ou por contaminação da água e alimentos pelos oocistos (Robertson et al. 2000). O PPP para *C. canis* varia entre 2 a 14 dias e excreção dos oocistos dura entre 25 a 80 dias (ESCCAP 2018a).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. é frequentemente assintomática, mas pode provocar doença clínica com diarreia grave (Bowman 2014). A capacidade de auto-infecção contribui para a cronicidade da infecção em hospedeiros imunossuprimidos (Bowman 2014).

O diagnóstico pode ser feito através de esfregaços fecais ou testes serológicos, como a técnica de Imunofluorescência Directa (Bowman 2014; ESCCAP 2018a). Os oocistos são bastante pequenos (variam de 4-6 µm) e a diferenciação de espécies apenas é possível através de testes moleculares, como o PCR. (Taylor et al. 2016; ESCCAP 2018a).

Não há um tratamento efectivo para este protozoário (Robertson et al. 2000; Taylor et al. 2016), no entanto a nitazoxanida reduz a excreção dos oocistos (este é o único fármaco aprovado pela agência Food and Drugs Administration (FDA) para o tratamento de criptosporidiose em humanos) (Moron-Soto et al. 2017). Porém, a maioria dos cães não necessita de uma terapêutica específica para o parasita, beneficiando apenas de tratamento de suporte, como fluidoterapia e anti-espasmódicos (ESCCAP 2018a). O controlo é importante pois os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são muito resistentes (Bowman 2014). A higienização dos espaços deve ser feita regularmente, com a remoção diária das fezes e desinfecção de todas as áreas, quer com recurso ao calor, por exemplo com vapor de água, ou a químicos (ESCCAP 2018a).

3.1.3.2. *Cystoisospora* spp.

As coccídeas são os protozoários mais frequentes no cão e gato, com presença a nível mundial (Zajac and Conboy 2012). Anteriormente designado por *Isospora*, o género *Cystoisospora* apresenta especificidade por hospedeiro (Roberts and Janovy Jr 2009). Os cães (HD) podem ser infectados pela espécie *Cystoisospora canis*, *C. ohioensis* e *C. burrowsi* (estas duas últimas, por vezes, são denominadas como o complexo-*C. ohioensis*) (Bowman

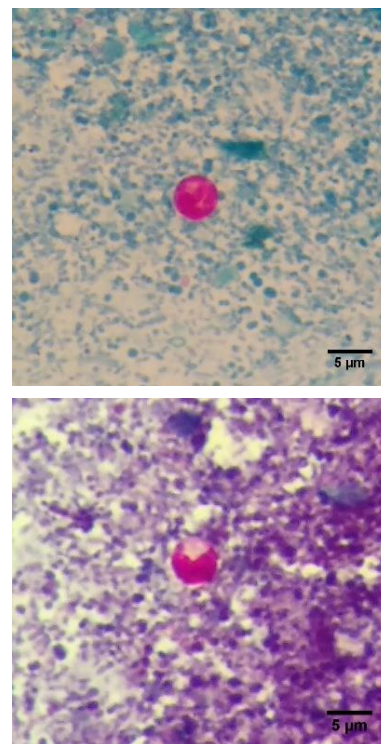


Figura 3 e 4 - Oocistos de *Cryptosporidium* spp. em esfregaços fecais corados pelo método Zhiel-Neelsen (original)

2014). Mas os roedores e aves podem ingerir os oocistos não esporulados excretados pelo HD e actuarem como HP (Taylor et al. 2016), nestes, o parasita permanece nos órgãos internos num estado dormente infectante (ESCCAP 2018a).

As espécies do género *Cystoisospora* que infectam o cão, não possuem potencial zoonótico (ESCCAP 2018a).

O ciclo de vida de *Cystoisospora* spp. é monoxeno e o HD infecta-se quando ingere os oocistos que contêm os esporozoítos infectantes (Bowman 2014). O PPP é de 6 a 10 dias (ESCCAP 2018b).

A infecção por *Cystoisospora* spp. pode causar doença, principalmente em cachorros, com enterite hemorrágica, diarreia e atrasos no crescimento (Foreyt 2001; ESCCAP 2018a).

O diagnóstico é realizado por observação dos oocistos através da técnica de flutuação (ESCCAP 2018a). Estes têm um formato oval, uma parede lisa e uma dimensão média de 20-24 µm no caso de *C. ohioensis*, de 18-21 µm no caso de *C. burrowsi*, e de 30-38 µm no caso de *C. canis* (Foreyt 2001; ESCCAP, 2018a).



Figura 5 - Oocistos de *Cystoisospora* spp. (original)

Uma vez que a excreção dos oocistos ocorre em largo número, em caso de infecção de um animal, todos os animais susceptíveis também devem ser tratados. Para o tratamento deve-se usar toltrazuril ou diclazuril. O recurso a estes fármacos antes do PPP, reduz a excreção dos oocistos e os sinais clínicos. O controlo passa pelas correctas medidas de higienização dos espaços como descrito para *Cryptosporidium* spp. (ESCCAP 2018a).

3.1.3.3. *Giardia duodenalis*

A espécie *Giardia duodenalis* (sinónimo *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*) infecta uma variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo o cão (ESCCAP 2018a). Actualmente é caracterizada consoante os *assemblages* (estirpes ou genótipos), de A a H, cada um com uma diferente especificidade de hospedeiros. Os *assemblages* C e D são comumente encontrados no cão, por vezes surge o *assemblage* A e raramente o *assemblage* B (ESCCAP 2018a). Apresenta distribuição cosmopolita, com uma prevalência superior em animais jovens, com menos de ano. No hospedeiro a *G. duodenalis* fixa-se no epitélio do intestino delgado, na forma de trofozoíto; estes também podem ser observados nas fezes frescas, principalmente em fezes diarreicas, todavia não são infectantes e rapidamente morrem. Nas fezes usualmente observa-se a forma infectante, os quistos, com 12 µm, forma elipsoidal e quatro núcleos (Bowman 2014).

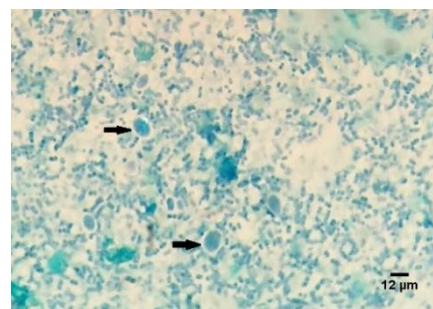


Figura 6 - Quistos de *Giardia* spp. em esfregaço fecal corado pelo método de Ziehl-Neelsen (original)

A espécie *G. duodenalis* apresenta um ciclo de vida monoxeno; os hospedeiros infectam-se quando ingerem os quistos, quer por transmissão fecal-oral ou por contaminação de alimentos ou águas (Bowman 2014; ESCCAP 2018a).

Os cães podem apresentar diarreia até 5 dias após a infecção, embora os quistos só apareçam nas fezes uma a duas semanas pós-infecção. Muitos cães são assintomáticos ou apresentam ocasionalmente fezes amolecidas (Bowman 2014). Crê-se que a infecção por *G. duodenalis* induza uma imunidade parcial, resultando numa redução ou ausência dos sinais clínicos e em alguns casos, na eliminação do agente (ESCCAP 2018a).

Para o diagnóstico pode-se observar os trofozoítos (em esfregaços de fezes frescas) ou os quistos. Estes podem ser concentrados e observados por técnicas coprológicas qualitativas como a técnica de flutuação, recorrendo ao sulfato de zinco (outras soluções concentradas, como a de sacarose, tendem a deformar os quistos, dificultando ou mesmo impossibilitando a identificação). Os quistos são frequentemente encontrados em animais assintomáticos e por vezes não são observados nos animais com giardiose clínica. Assim, rotineiramente recorre-se aos testes serológicos, tanto nos animais como nos humanos. Pode-se ainda utilizar a técnica de Imunofluorescência Directa para pesquisa do antígeno de *G. duodenalis* nas fezes (Bowman 2014).

Para o tratamento utiliza-se o febendazol ou a combinação de febantel-pirantel-praziquantel. Foi mostrado o sucesso do albendazole, mas este fármaco tem potencial para induzir toxicidade da medula óssea, sendo recomendado precaução na sua escolha. Outros fármacos incluem a quinacrina, metronidazole e tinidazole (Bowman 2014). Moron-Soto (2017) demonstrou a eficácia da nitrazoxanida na redução da excreção de quistos. O controlo adquire uma elevada importância e envolve a prevenção da contaminação fecal da comida e água, assim como a higienização e desinfecção do ambiente, por exemplo com lixívia a 1% (Bowman 2014).

A espécie *G. duodenalis* tem potencial zoonótico e é considerada uma zooantroponose, pois também ocorre a infecção dos animais através do Homem (Bowman 2014). No Homem a infecção é quase sempre pela *assemblage* A ou B (ESCCAP 2018a). A infecção por *G. duodenalis* possui um acréscimo de preocupação para saúde pública, dado estarem reportados casos de resistência à terapêutica (Bowman 2014; Moron-Soto 2017).

3.2. Parasitas pulmonares

Os cães podem ser infectados com vários parasitas com eleição pelo sistema respiratório ou com passagem por este durante o seu ciclo de vida (Bowman 2014), mas as espécies com maior relevância para o cão são: *Angiostrongylus vasorum*, *Filaroides hirthi*, *Crenosoma vulpis*, *Eucoleus aerophilus* (sinónimo *Capillaria aerophila*), *Eucoleus boehmi* (sinónimo *Capillaria boehmi*) e *Oslerus osleri* (Alho 2013; ESCCAP 2017). Considerando a

importância de *Angiostrongylus vasorum*, devido às implicações clínicas inerentes à sua infecção, esta será a única espécie abordada em detalhe nesta dissertação.

3.2.1. *Angiostrongylus vasorum*

A espécie *Angiostrongylus vasorum* está distribuída por toda a Europa, com focos endêmicos. Os HD são o cão e raposas, que se infectam ao ingerir as larvas infectantes (L3) presentes nos HI, caracóis ou lesmas. Após ingestão, as L3 migram para os linfonodos, realizam as mudas e de seguida migram para o pulmão e artérias pulmonares, onde maturam e se estabelecem. O HD excreta nas fezes as L1 para o ambiente. O PPP é de 40 a 49 dias, sendo que o PP pode ir até cinco anos (ESCCAP 2017).

Inicialmente a infecção por *A. vasorum* é assintomática, surgindo depois tosse, taquipneia e dispneia. Ocasionalmente observam-se sinais de coagulopatia, como hematomas subcutâneos, e em migrações erráticas, sinais neurológicos. Pode ocorrer morte súbita do animal mesmo na ausência de sinais respiratórios (ESCCAP 2017).

O teste de eleição para o diagnóstico desta espécie é a Técnica de Baermann, mas também se pode detectar as larvas através de lavagem brônquica ou utilizar testes serológicos comerciais (Alho 2013; ESCCAP 2017).

Para o tratamento recorre-se ao uso de febendazole, ivermectina, levamisole ou uma combinação de imidacloprid com moxidectina (Bowman 2014).

Esta espécie não apresenta potencial zoonótico (ESCCAP 2017).

3.3. Parasitas hemáticos

Diversos parasitas atingem o sistema circulatório do cão, por vezes apenas de forma temporária, durante migrações para completar o seu ciclo biológico, mas alguns têm como alvo este sistema ou as células hemáticas. Será nestes que se focará a revisão bibliográfica.

Os parasitas hemáticos relevantes para o cão têm ainda uma característica em comum, o modo de transmissão através de vectores (CVBD 2019). O termo doenças caninas transmitidas por vectores, ou a sigla CVBD, proveniente do inglês *Canine Vector Borne Diseases*, refere-se a um largo número de doenças infecciosas que se têm tornado cada vez mais importantes, quer pelo conhecimento de mais agentes patogénicos, como pelo resultado da expansão geográfica dos agentes patogénicos e dos artrópodes que os transmitem, devido às alterações climáticas e biogeográficas favoráveis (Bowman 2014). Os vectores transmitem diversos agentes patogénicos, desde vírus, a riquetsias e outras bactérias, a protozoários e helmintos. O mesmo vector pode transmitir mais do que um agente patogénico, sendo que as co-infecções com CVDB são frequentes e têm implicações diagnósticas, terapêuticas e prognósticas importantes (Breitschwerdt 2007).

Neste ponto desta dissertação discursaremos acerca dos agentes patogénicos mais relevantes presentes no sangue dos cães e de acordo com o contexto geográfico/nacional.

3.3.1. Helmintes transmitidos por vectores

Um grande número de helmintes pode ser transmitido por artrópodes, sendo assim considerados CVBD. No contexto dos parasitas hemáticos e nos cães, *Dirofilaria immitis* é o helminte transmitido por vector mais importante (Taylor et al. 2016).

3.3.1.1. *Dirofilaria immitis*

O nemátode *Dirofilaria immitis* é um dos parasitas mais mortíferos para os cães (Taylor et al. 2016). Os adultos alojam-se nas artérias pulmonares, com os machos a atingir entre 12 a 20 cm e as fêmeas entre 25 a 31 cm (Alho 2017). Os HD são os cães, gatos e outros carnívoros (ESCCAP 2017) mas a infecção por *D. immitis* já foi reportada em diversas espécies (Almeida 2010), incluindo o Homem. No entanto o Homem é considerado um hospedeiro acidental, quando infectado a maioria das larvas é eliminada pelo sistema imunitário e o parasita não completa o seu ciclo de vida, ou causam nódulos pulmonares (Vieira 2016). Os mosquitos culicídeos actuam como vectores biológicos para a *D. immitis*; na ilha da Madeira estão reportados os culicídeos dos géneros *Aedes*, *Culiseta* e *Culex* (Santa-Ana et al. 2006; Clairouin 2009).

A espécie *D. immitis* tem distribuição mundial e é endémica no sul da Europa e Portugal (AHS 2014; ESCCAP 2019); na ilha da Madeira, é hiperendémica (Alho 2017).

O ciclo de vida é heteroxeno, sendo que os HD são infectados aquando da hematofagia dos culicídeos. No HD as filárias adultas podem sobreviver e produzir microfíliarias até cinco anos, e estas últimas podem sobreviver até dois anos e meio em circulação (Bowman 2014). O PPP é de seis a nove meses. (Bowman 2014).

A infecção por *D. immitis* é grave e potencialmente fatal para os cães. Os sinais clínicos são graduais, manifestando-se cinco a sete meses pós-infecção. Por vezes os animais com uma carga parasitária baixa não apresentam sinais clínicos. Quando presentes, observa-se tosse crónica, dispneia e por vezes síncope, devido à hipertensão pulmonar (Nelson and Couto 2009; CVDB 2019). Posteriormente, aquando desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva direita, pode ocorrer ascite e edema dos membros, em conjunto com anorexia e desidratação. Os cães podem ainda desenvolver uma forma hiperaguda, a síndrome da veia cava, em que subitamente apresentam letargia, dispneia, mucosas pálidas, fraqueza e pulso jugular, acompanhado de hemoglobínemia e hemoglobinúria. Nos casos crónicos da doença pode existir uma agudização dos sinais, após tromboembolismo devido à morte natural dos parasitas, com os cães a exibir dispneia aguda, potencialmente fatal, e hemoptise (Bowman 2014; Alho 2017; ESCCAP 2017). A espécie *D. immitis* alberga a bactéria gram negativa *Wolbachia pipientis*, que são endossimbiontes obrigatórias e são transmitidas verticalmente (as filárias fêmeas adultas transmitem à sua descendência). Estas bactérias têm

um papel relevante na patogénese da dirofilariose, intervindo na inflamação e resposta imunitária do hospedeiro (Bowman 2014; Alho 2017; ESCCAP 2017).

O diagnóstico de infecção por *D. immitis* em cães pode ser feito através da observação das microfilárias ou detecção dos antígenos no sangue ou plasma. As microfilárias surgem em circulação cerca de 180 dias (6 meses) pós-infecção; a partir deste período a observação pode ser feita ao microscópio óptico, utilizando uma gota a fresco de sangue, no entanto esta técnica é pouco sensível e não permite a diferenciação de microfilárias de *D. immitis* de outras microfilárias. A observação pode ser aprimorada através de métodos de concentração, como o teste de filtração e a técnica de Knott modificada; esta última é a técnica recomendada para observação morfológica e diferenciação de outras microfilárias, como as de *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides* e *Acanthocheilonema reconditum*, presentes em Portugal (Alho 2017). Para identificação da espécie, as microfilárias devem ser analisadas conforme os padrões morfométricos descritos por Magnis et al. (2013) (Tabela 3).

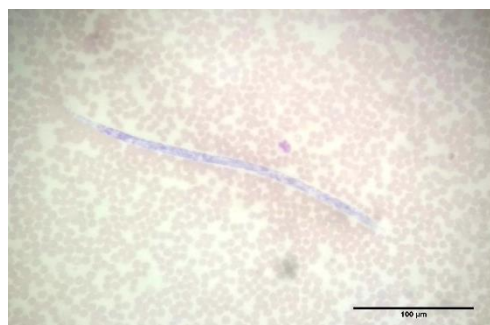


Figura 7 - Microfilária em esfregaço de sangue corado pelo método de Giemsa (original)

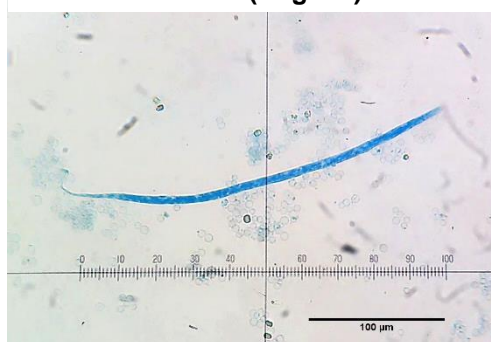


Figura 8 - Microfilária de *Dirofilaria immitis* obtida pela técnica de Knott (original)

Tabela 3 - Características morfológicas e morfométricas das microfilárias caninas (Adaptado de Magnis et al. (2013))

Espécie	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Características
<i>Dirofilaria immitis</i>	301,77 ± 6,29	6,30 ± 0,26	Extremidade anterior em forma cónica e cauda pontiaguda e recta
<i>Dirofilaria repens</i>	369,44 ± 10,76	8,87 ± 0,58	Extremidade anterior em forma cónica e cauda curvada
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	259,43 ± 6,69	5,09 ± 0,47	Extremidade anterior arredondada e cauda recta
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	264,83 ± 5,47	4,63 ± 0,52	Extremidade anterior achatada e cauda curva com um pequeno gancho

Um outro método de diferenciação das microfilárias é através dos padrões singulares após coloração histoquímica por fosfatase ácida. A espécie *D. immitis* apresenta duas áreas com actividade enzimática, o poro excretor e o poro anal; *D. repens* uma área, o poro anal; *A. dracunculoides* apresenta três áreas, o poro anal, corpo interno e poro excretor; e *A. reconditum* cora com um padrão difuso (Magnis et al. 2013).

Alguns cães podem ser amicrofilarémicos, ou seja, sem microfilárias em circulação; o animal pode estar no período pré-patente da infecção, pode ter uma infecção unissexo ou pode ter ocorrido a eliminação das microfilárias pelo sistema imunitário do hospedeiro (ESDA

2017). Para estes animais o diagnóstico através da detecção do antígeno de *D. immitis* é útil (Alho 2017). Os antígenos são detectáveis no sangue cinco meses após infecção (Bowman 2014). Existem diversos *kits* comerciais (testes imunoenzimáticos (ELISA) e ensaios imunocromatográficos) para a detecção dos antígenos com elevada especificidade e sensibilidade. Outra opção para o diagnóstico de *D. immitis* é através de testes moleculares, com a amplificação do DNA de microfilárias por PCR. O recurso à radiografia e ecocardiografia são úteis para confirmar o diagnóstico em situações em que os testes anteriores sejam dúbios, assim como para determinar a extensão das alterações patológicas e categorizar a gravidade da doença para aplicar a terapêutica mais adequada (AHS 2014; ESDA 2017; ESCCAP 2017).

O objectivo do tratamento na dirofilariose é melhorar as condições clínicas do animal e eliminar todos os estados do parasita, com o mínimo de complicações possível. Deve-se utilizar uma abordagem multifactorial, iniciando a terapêutica com microfilaricidas, como as lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas); seguida da administração de doxiciclina, para redução do número de bactérias *Wolbachia*; e posterior terapêutica adulticida, utilizando o dicloridrato de melarsomina; combinado com restrição ao exercício físico, de modo a reduzir o risco de complicações tromboembólicas; e terapia coadjuvante, como a administração de glucocorticóides (prednisona), para controlar os sinais clínicos do tromboembolismo pulmonar. É recomendado a remoção cirúrgica das filárias adultas em cães que desenvolvam a síndrome da veia cava (AHS 2014).

A prevenção da dirofilariose é realizada através da administração mensal de lactonas macrocíclicas, por via oral ou tópica (AHS 2014; ESDA 2017). Em Portugal está ainda aprovado uma lactona macrocíclica injectável, a moxidectina, comercializada como Guardian® SR Injectável (Lilly Portugal – Produtos Farmacêuticos, Lda, Queijas, Portugal), para uso em cães com mais de doze semanas e que confere uma protecção de um ano (DGV 2010; ESCCAP 2017). A ESCCAP (2017) sugere que prevenção mensal em zonas hiperendémicas (como é o caso da ilha da Madeira) deva decorrer durante o ano inteiro.

3.3.2. Protozoários transmitidos por vectores

Dentro das CVBD, existem protozoários transmitidos tanto por carraças como por mosquitos e moscas que são importantes quer do ponto de vista da saúde animal como do ponto de vista zoonótico. Destacam-se os géneros *Babesia*, *Hepatozoon*, *Leishmania* e *Trypanosoma*; no entanto no contexto nacional apenas estão reportados os protozoários do género *Babesia* e as espécies *Hepatozoon canis* e *Leishmania infantum* (ESCCAP 2019; CVBD 2019). A espécie *Leishmania infantum* é transmitida por insectos flebótomos e é extremamente importante para o cão e saúde pública, dado o seu potencial zoonótico e a doença provocada ser potencialmente fatal (Cardoso et al. 2012). Em Portugal, a leishmaniose é endémica em diversas áreas (Santos-Gomes and Pereira da Fonseca 2008;

Maia et al. 2011). No entanto na Ilha da Madeira, os casos positivos observados foram relatados através de inquéritos realizados aos médicos veterinários e eram provenientes de animais importados, em que a infecção ocorreu em Portugal Continental (Oliveira et al. 2010). Por este motivo, e uma vez que não foi alvo do estudo exposto nesta dissertação, não foi feita uma revisão bibliográfica para este protozoário, apesar da sua importância no contexto nacional.

3.3.2.1. *Babesia* spp.

O género *Babesia* é um parasita intraeritrócitário, transmitido por ixodídeos. As espécies capazes de infectar o cão são: *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* e *Babesia annae* (sinónimo *Theileria annae*, *Babesia microti*-like) (Taylor et al. 2016). A espécie *B. canis* é cosmopolita e a espécie *B. gibsoni* apesar de ter uma distribuição mundial, é esporádica e rara na Europa (Bowman 2014; ESCCAP 2019). A babesiose canina é endémica no Norte de Portugal, sendo as subespécies *B. canis canis* e *B. canis vogeli*, os agentes responsáveis pela doença no país e na Europa. A espécie *B. annae* foi relatada até hoje, em apenas três animais no Norte de Portugal (Simões et al. 2011), assim, dado a sua baixa prevalência, não será abordada na revisão bibliográfica desta dissertação.

A espécie *Babesia canis* é caracterizada por piroplasmas grandes, em forma de pêra e 4-5 µm de comprimento; são também descritas formas amebóides com cerca de 2-4 µm de diâmetro e com um vacúolo no seu interior. Na espécie de *B. canis* reconhece-se pelo menos três subespécies: *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* e *Babesia canis vogeli* (Bowman 2014). A espécie *Babesia gibsoni* é um piroplasma mais pequeno, caracterizado por uma forma anelar com 3 µm de diâmetro (Taylor et al. 2016).

As várias espécies de *Babesia* são na sua generalidade hospedeiro-específicas, quer no HD como no HI/vector (ESCCAP 2019). O HD de *B. canis* e *B. gibsoni* é o cão (Bowman 2014) e cada espécie e sub-espécie é transmitida por um vector diferente como exposto na Tabela 4 (Bowman 2014; ESCCAP 2019).

Tabela 4 - *Babesia* spp. com a sua distribuição, vector e virulência (Adaptado de Taylor et al. (2016))

Espécie	Subespécie	Distribuição	Vector	Virulência
<i>B. canis</i>	<i>B. canis canis</i>	Sul e centro Europa	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Moderada a Grave
	<i>B. canis rossi</i>	Sul de África	<i>Haemophysalis loachi</i>	Grave
	<i>B. canis vogeli</i>	Mundial	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Leve a moderada
<i>B. gibsoni</i>	-	Mundial	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Haemaphysalis bispinosa</i> e <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Moderada a grave

O género *Babesia* tem um ciclo de vida heteroxeno. O cão é infectado aquando da hematofagia do ixodídeo, através dos esporozoítos infectantes presentes na saliva. No vector há transmissão transtadial e transovárica (Bowman 2014). Como parasitas intraeritrócitários

podem ainda serem transmitidas ao cão por transfusão sanguínea (Stegeman et al. 2003). No caso de *B. gibsoni*, Yeagley et al. (2009, p.535) citada por Bowman (2014, p.111), nos EUA, comprovaram que também pode ser transmitida directamente entre cães durante lutas, e Fukumoto et al. (2005) comprovaram a transmissão transplacentária no cão.

A gravidade da babesiose depende da espécie e subespécie de *Babesia* infectante e de outros factores do hospedeiro como a idade, o estado imunitário e presença de co-infecções. Os animais tipicamente manifestam febre, anemia hemolítica, anorexia, letargia, vômito, icterícia e esplenomegália (Bowman 2014; Taylor et al. 2016). Nos casos complicados a mortalidade excede os 80% (Taylor et al. 2016). Os cachorros apresentam sinais clínicos mais graves independentemente da espécie e subespécie de *Babesia*. Em casos crónicos da doença observa-se depressão, febre intermitente, anemia, miosite e artrite (ESCCAP 2019). A babesiose canina pode ser subclínica ou até fatal, mas a maioria dos cães sujeitos a tratamento recupera; permanecem, no entanto, com uma infecção subclínica (Bowman 2014).

A primeira abordagem no diagnóstico, consiste na recolha da história clínica em que se averigua a exposição prévia ao vector e a presença dos sinais clínicos característicos. A confirmação do diagnóstico realiza-se por observação microscópica do parasita em esfregaços de sangue (Bowman 2014); por testes serológicos, sendo o teste de IFI, dentro destes, o mais usado; ou ainda por métodos moleculares, como o PCR. Os testes de IFI são métodos indirectos de detectar uma infecção, com a desvantagem de existir reactividade cruzada entre espécies de *Babesia* (Solano-Gallego and Baneth 2011).

O tratamento da babesiose consiste na administração de dipropionato de imidocarb, isetionato de fenamidina, isetionato de pentamidina ou aceturato. O tratamento com atovaquona em combinação com azitromicina reduz ou elimina a parasitémia por *B. gibsoni* (Bowman 2014). Adicionalmente e sempre que necessário, deve ser utilizada terapêutica de suporte como a fluidoterapia e transfusões de sangue (CVBD 2019).

A profilaxia incide na prevenção da picada do vector. Outro factor importante é a educação dos detentores para a inspecção de carraças nos seus animais e vigilância dos sinais clínicos, de modo a instituir a terapêutica o mais cedo possível. Devem ainda evitar a deslocação de animais de zonas não endémicas para zonas endémicas (CVDB 2019). Na Europa, para *B. canis*, está disponível uma vacina que confere até seis meses de protecção, embora não ofereça protecção cruzada entre diferentes espécies de *Babesia* ou mesmo subespécies de *B. canis* (Taylor et al. 2016).

As espécies *B. canis* e *B. gibsoni* não têm potencial zoonótico. A babesiose humana é uma doença zoonótica emergente, mas as espécies comumente implicadas são *Babesia microti* e *Babesia divergens*, que não estão relacionadas com o cão (Homer et al. 2000).

3.3.2.2. *Hepatozoon canis*

O protozoário *Hepatozoon canis* apresenta distribuição mundial e é uma CVBD atípica. A transmissão do agente patogénico para o HD não ocorre pela picada do vector, mas sim quando o HD ingere o vector, provavelmente durante o *grooming* (Bowman 2014; Taylor et al. 2016). Por sua vez, o vector infecta-se aquando da hematofagia (Bowman 2014). O HD e reservatório é o cão, e o HI e vector é o *R. sanguineus* (Bowman 2014). Baneth et al. (2001) documentaram a transmissão transtadial no vector *R. sanguineus* e Murata et al. (1993) demonstraram experimentalmente a transmissão vertical em cães.

A hepatozoonose canina é usualmente uma infecção sub-clínica (Bowman 2014), mas aquando da presença de doença clínica, os sinais clínicos e laboratoriais observados são inespecíficos e similares a outras CVBD (Lasta 2008). Podemos detectar febre, anorexia, perda de peso, anemia, corrimento ocular e fraqueza dos membros (Ivanov and Tsachev 2008). A patogenicidade de *H. canis* e as manifestações clínicas variam de acordo com a idade do hospedeiro, grau de infecção e associação com outras doenças (Lasta 2008).

Consoante a sua fase de desenvolvimento, *H. canis* infecta diferentes tecidos e apresenta características distintas; o mais observado é na sua forma de gamonte, no interior dos neutrófilos e monócitos do HD, assemelhando-se a uma cápsula grande intracelular com coloração pálida (Lasta 2008). O diagnóstico baseia-se na observação dos gamontes no esfregaço de sangue, no entanto estes podem não ser detectáveis no sangue periférico devido a parasitemia intermitente ou em situações de doença crónica (é mais frequente a observação durante a fase aguda da infecção) (Lasta 2008). Assim, a ausência do parasita num esfregaço de sangue, não exclui a infecção. Pode-se realizar um esfregaço a partir da camada leucocitária (*buffy coat*) na tentativa de aumentar a sensibilidade do teste, ou como alternativa, pode-se recorrer aos testes serológicos, por IFI, ELISA, ou Western blot, pois apresentam maior sensibilidade; ou ainda aos testes moleculares por PCR, que possuem uma alta especificidade e sensibilidade (Lasta 2008).

O tratamento da hepatozoonose canina é realizado com dipropionato de imodocarb, até que não se detectem os gamontes nos esfregaços de sangue (Bowman 2014). Outros fármacos, como toltrazuril, clindamicina, diminazene, primaquina, tetraciclina, trimetropim-sulfonamida, têm sido aplicados no tratamento da hepatozoonose, mas com uma resposta variável. O tratamento muitas vezes não elimina por completo o agente patogénico no hospedeiro, no entanto todos os cães infectados, com ou sem manifestação clínica devem ser tratados (Lasta 2008). Quando existem poucos gamontes em circulação o prognóstico é bom, mas quando se verifica um grande número, o prognóstico é reservado (Bowman 2014).

O controlo da hepatozoonose canina é feito através da profilaxia contra os ectoparasitas, visando eliminar a interacção entre o vector e o hospedeiro (Lasta 2008).

O protozoário *H. canis* não tem potencial zoonótico (Bowman 2014).

3.3.3. Riquétsias transmitidas por vectores

O termo Riquétsia refere-se um largo número de bactérias intracelulares obrigatórias, gram-negativas, pertencentes à ordem Rickettsiales. As carraças são os vectores mais comuns na transmissão de riquétsias, mas algumas, como o género *Wolbachia* e *Neorickettsia*, usam os helmintes como vector. As riquétsias relevantes para os cães e reportadas em Portugal são: *Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis*, *Rickettsia* spp. e *Wolbachia* spp. (CVBD 2019), assim a revisão bibliográfica desta dissertação incidirá apenas nestas.

Uma vez que a espécie *Wolbachia pipientis* é endossimbionte do nemátode *Dirofilaria immitis*, com influência na patogenia da dirofilariose (Bowman 2014), foi anteriormente descrita a sua importância em associação com a dirofilariose.

3.3.3.1. *Anaplasma* spp.

Dentro do género *Anaplasma*, há duas espécies capazes de infectar o cão: *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys* (Taylor et al. 2016). A espécie *A. phagocytophilum*, originalmente referida como *Ehrlichia phagocytophila*, é uma bactéria gram negativa, em forma de mórula, intracelular obrigatória, observada nos granulócitos do hospedeiro; por sua vez a espécie *A. platys* infecta as plaquetas (Bowman 2014).

A espécie *A. phagocytophilum* infecta cães, roedores, cavalos, ruminantes, aves e humanos e é transmitida por ixodídeos, sendo *Ixodes ricinus* o vector mais importante na Europa (Cardoso et al. 2012). No vector há multiplicação da bactéria com transmissão transtadial (Bowman 2014). Esta bactéria tem distribuição mundial e acompanha a distribuição do seu vector; a infecção é sazonal, pois o vector é mais activo entre Setembro e Março (Silva et al. 2006). A espécie *A. platys* infecta o cão e apesar de ainda não estar confirmado, crê-se que a transmissão ocorra pelo vector *R. sanguineus* aquando da hematofagia (Bowman 2014).

Nos cães, a espécie *A. phagocytophilum* provoca a Anaplasmoze Granulocítica Canina, após um período de incubação de 1 a 2 semanas. Caracteriza-se por letargia e febre, claudicação, vômito, diarreia, anorexia e ocasionalmente diátese hemorrágica. Frequentemente observa-se trombocitopenia, neutropenia, linfopenia e anemia não regenerativa. A maioria das infecções caninas são auto-limitantes, mas a bactéria pode persistir em alguns cães originando recaídas da doença (Greig and Armstrong 2006). A espécie *A. platys*, provoca a anaplasmoze trombocítica canina, caracterizada por uma parasitémia inicial, com a infecção de um elevado número de plaquetas e uma diminuição brusca do seu número após alguns dias. Posteriormente as plaquetas voltam a aumentar e retornam aos valores de referência dentro de quatro dias. A parasitémia e trombocitopenia tendem a ocorrer de forma periódica, em intervalos de uma a duas semanas. Os sinais clínicos começam após um período de incubação de 8-15 dias e incluem mucosas pálidas,

trombocitopenia cíclica e linfadenomegália, mas na maioria das vezes, esta é uma infecção subclínica (Machado et al. 2010). Os sinais clínicos podem ser exacerbados por co-infecção com outros agentes de CVBD (Cardoso et al. 2012).

O diagnóstico tem por base a história clínica, sinais clínicos e alterações hematológicas, carecendo de confirmação laboratorial. A mórula de *A. phagocytophilum* pode ser observada em granulócitos (neutrófilos/eosinófilos) e a mórula de *A. platys* pode ser observada como inclusões basofílicas no interior das plaquetas, em esfregaços de sangue corados pelo método de Giemsa (Greig and Armstrong 2006). As inclusões de *A. platys* apresentam semelhanças com as granulações intracitoplasmáticas de plaquetas normais, o que pode originar erros no diagnóstico laboratorial (Machado et al. 2010). O esfregaço de sangue é uma técnica pouco sensível, devido à parasitemia transitória. Os testes serológicos, como ELISA, Dot-blot ELISA e Western blot, são úteis na detecção de anticorpos, contudo não permitem a diferenciação de espécies; nos testes serológicos por IFI para pesquisa de Ac anti-*A. phagocytophilum* está descrito reacção cruzada entre *A. phagocytophilum* e *A. platys*. O PCR é um método com elevada sensibilidade e especificidade, e permite o diagnóstico precoce (Greig and Armstrong 2006; Machado et al. 2010).

No tratamento da Anaplasmosose é indicado a doxiciclina ou a tetraciclina; o dipropionato de imidocarb é eficaz e recomendado em casos de co-infecção, por exemplo com *Babesia* spp. (Machado et al. 2010). A profilaxia é baseada no controlo do vector, seguindo as recomendações comuns às restantes CVBD.

A bactéria *A. phagocytophilum* é responsável pela Anaplasmosose granulocítica nos humanos, que, em casos graves, pode ser fatal. A espécie *A. platys* não apresenta potencial zoonótico (Bowman 2014).

3.3.3.2. Ehrlichia canis

A espécie *Ehrlichia canis* é uma bactéria gram negativa, intracelular obrigatória em monócitos e macrófagos, com a forma de uma mórula (Taylor et al. 2016), que infecta o cão. Apresenta distribuição mundial, sendo a erliquiose monocítica canina uma infecção importante e comumente reportada na Europa. É transmitida pela picada de *R. sanguineus* mas também foi demonstrada a capacidade de transmissão por *Dermacentor variabilis*. No vector há transmissão transtadial, mas não transovárica (Bowman 2014).

A bactéria *E. canis* provoca uma doença febril grave em cães, caracterizada por três fases: aguda (2-4 semanas), subclínica (meses a anos) e crónica, apesar de nem todos os cães desenvolverem esta última fase. Os sinais clínicos variam de subclínicos a fatais (Cardoso et al. 2012) e são marcados por hipertermia, letargia, anorexia, perda de peso, linfadenomegália, diátese hemorrágica e anemia não regenerativa normocítica normocrómica, trombocitopenia não cíclica e leucopénia ligeira a moderada (Machado et al. 2010; Cardoso

et al. 2012; Bowman 2014). A infecção crónica pode causar emaciação e hipoplasia da medula óssea, originando pancitopenia (Bowman 2014).

O diagnóstico deve ser baseado na história clínica, nos sinais clínicos e alterações hematológicas sugestivas, e deve ser confirmado por testes laboratoriais. Poderá ser feita a visualização de mórulas de *E. canis* nos monócitos circulantes de cães infectados, através de um esfregaço sanguíneo ou de punções aspirativas de linfonodos, fígado e medula óssea (CVBD 2019); mas a riquetsiémia é por vezes tão baixa que a ausência de mórulas não deve excluir o tratamento quando existe suspeita da infecção (Bowman 2014). O diagnóstico pode ser realizado através da técnica de IFI, que apresenta elevada sensibilidade e especificidade e é considerado o teste de eleição serológico; ou ainda por testes moleculares, através da detecção do ADN do agente por PCR (CVBD 2019).

O antibiótico de eleição é a doxiciclina, mas existem diversos fármacos eficazes como a tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina, associada ou não a dipropionato de imidocarb (Warner and Harrus 2000; CVBD 2019). O controlo é feito pela prevenção da picada do vector transmissor (Warner and Harrus 2000).

A espécie *E. canis* apresenta potencial zoonótico (Bowman 2014) com relatos de infecções em humanos na Venezuela (CVBD 2019). Outras espécies do género *Ehrlichia* com importância para os cães e saúde pública, dado o seu potencial zoonótico, são *Ehrlichia ewingii*, que afecta primariamente neutrófilos e ocasionalmente eosinófilos, e *Ehrlichia chaffeensis* que provoca a erliquiose monocítica humana e já foi reportada em cães. Contudo ainda não foi descrita a presença destes agentes em cães em Portugal (Seixas et al. 2011; CVBD 2019), apesar de existirem registos serológicos recentes que apontam para a exposição do Homem a *E. chaffeensis* no país (Santos 2019).

3.3.3.3. *Rickettsia conorii*

A espécie *Rickettsia conorii* trata-se de uma bactéria pleomórfica, gram negativa pequena, com morfologia cocóide e com dimensões de 0,3-0,5 µm por 0,9-1,6 µm (Fournier and Raoult 2007). É intracelular obrigatória e infecta as células endoteliais (Taylor et al. 2016) de roedores, cães, bovinos, ovelhas, cabras e o Homem (Bowman 2014). Está distribuída pela Europa, Ásia e África (Taylor et al. 2016), com vários estudos a mostrar uma seroprevalência elevada na população canina portuguesa (Alexandre 2005; Silva 2011; Santos 2014). Na Europa o vector é *R. sanguineus*, infectando o cão aquando da hematofagia (Bowman 2014).

A infecção por *R. conorii* provoca uma rickettsémia transitória e a doença parece ser subclínica (Taylor et al. 2016). O sinal clínico mais reportado é o aparecimento súbito de febre alta, encontrando-se descrito dor, eritema e edema no local da picada de *R. sanguineus*, e linfadenopatia regional, justificado pela replicação da bactéria, que provoca lesão endotelial directa originando inflamação e necrose vascular. Pode-se detectar alterações hematológicas

e bioquímicas como uma anemia microcítica e hiperocrômica, trombocitopenia, neutrofilia e hipoproteinémia (Walker et al. 2007).

O diagnóstico baseia-se na combinação da história clínica, sinais clínicos, alterações laboratoriais e confirmação do agente, por esfregaço sanguíneo ou por esfregaço por aposição de órgãos, assim como por testes serológicos (Taylor et al. 2016).

A infecção por *R. conorii* normalmente não requer terapêutica, mas o uso da tetraciclina ou da doxiciclina é eficaz (Taylor et al. 2016). O controlo passa pela prevenção da picada do vector, ou seja, a implementação de profilaxia contra os ectoparasitas (CVBD 2019). Possui potencial zoonótico, provocando a Febre Escaro-Nodular no Homem (Bowman 2014).

3.3.4. Outras bactérias transmitidas por vectores

Além das riquetsias existem outras bactérias transmitidas por vectores, como *Bartonella* spp., *Borrelia* spp. e *Mycoplasma* spp. (Bowman 2014). Apesar da importância como CVBD e no panorama nacional de *Bartonella* spp. e *Borrelia* spp. uma vez que não foram alvo do estudo exposto nesta dissertação, a revisão bibliográfica não incidirá nestas. Dentro do género *Mycoplasma*, destaca-se a espécie *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus* M. haematoparvum, contudo uma vez que este último é menos patogénico e só ocasionalmente descrito em cães também não será abordado na revisão (Bowman 2014; ESCCAP 2019).

3.3.4.1. *Mycoplasma haemocanis*

O género *Mycoplasma*, anteriormente conhecido por *Haemobartonella*, designa pequenas bactérias gram negativas pleomórficas ligadas à superfície dos eritrócitos (Taylor et al. 2016). A espécie *M. haemocanis* foi isolada em canídeos na Europa e nos EUA (CVBD 2019) com vários estudos a mostrar a sua presença em território nacional (Novacco et al. 2010; Vidal et al. 2014; Duarte 2016). É transmitida ao cão pela picada do vector *R. sanguineus* e mantida na população de carraças tanto por transmissão transtadial como transovárica. A infecção do HD pode ainda ocorrer através de transfusões sanguíneas, uma vez que são organismos intraeritrocitários. Nos gatos está ainda descrito a transmissão vertical de *Mycoplasma* spp., mas nos cães, embora se julgue acontecer, ainda não foi confirmado (CVBD 2019).

Provoca a micoplasmose hemotrópica canina, usualmente subclínica, contudo, na presença de doença clínica observa-se anemia hemolítica, depressão, anorexia, perda de peso, febre e em casos graves, morte. As co-infecções com *Ehrlichia* spp. ou *Babesia* spp. aumentam a patogenicidade e agravam a doença clínica, podendo conduzir a hemoplasmose aguda clínica (CVBD 2019). O diagnóstico pode ser feito através da observação do agente em esfregaços de sangue, mas o número de microorganismos em circulação é bastante

variável e pode originar falsos-negativos em até 50% dos casos; o método de eleição são os testes PCR, que apresentam elevada sensibilidade (CVBD 2019).

O tratamento recorre ao uso da tetraciclina, oxitetraciclina ou doxiciclina, complementado ou não com glucocorticoides, para controlar a anemia hemolítica; alguns animais podem necessitar de transfusões sanguíneas. Apesar da implementação de terapêutica, tal como sucede na hemoplasmosse felina, é improvável a eliminação completa do agente. Deste modo, o controlo do vector é a base para a prevenção da infecção por *M. haemocanis* (CVBD 2019). Não existem casos notificados de hemoplasmosse no Homem, todavia foram reportados organismos que se assemelham a micoplasmas hemotrópicos em indivíduos imunodeprimidos (CVBD 2019).

4. OBJECTIVOS

O trabalho experimental realizado nesta dissertação teve como objectivos:

1. Identificação e determinação da prevalência dos parasitas gastrointestinais, pulmonares e hemáticos em cães com detentor e cães residentes em canis/associações na cidade do Funchal;
2. Realização de um inquérito aos detentores, aquando da recolha das amostras fecais, para avaliar o plano de desparasitação em vigor e o estilo de vida do animal;
3. Determinação da influência de diversos factores, entre eles, idade, sexo, raça, freguesia de residência, co-habitação intra-espécie e interespécies, acesso a espaços partilhados por outros animais (ex. jardins e parques) e o tipo de alimentação [processada ou caseira (cozinhada ou com alimentos crus)] nos resultados obtidos;
4. Avaliação do potencial zoonótico dos parasitas encontrados e a sua relevância para a saúde pública.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Caracterização da área geográfica em estudo

O alvo deste estudo foram os cães residentes na cidade do Funchal, capital do Arquipélago da Madeira. O Arquipélago da Madeira [categorizado como NUTS I, II e III - Região Autónoma da Madeira (PORDATA 2019)] encontra-se situado no Oceano Atlântico, na placa africana, a cerca de 978 km a sudoeste de Lisboa e 700km a oeste da costa africana (Anexo 1). O arquipélago é constituído pelas ilhas habitadas, Madeira e Porto Santo, e pelos dois conjuntos de ilhas não habitadas, Desertas e Selvagens (Madeira 2019). A cidade do Funchal está situada na encosta sul da ilha da Madeira com uma área de 76,16 km², dividida

em 10 freguesias: Imaculado Coração de Maria, Monte, Santa Luzia, Santa Maria Maior, Santo António, São Gonçalo, São Martinho, São Pedro, São Roque e Sé (CMF 2007).

Segundo o INE (2012) e os censos de 2011, o Funchal apresentava uma população residente de 111 892 habitantes, com uma densidade populacional de 1 469,6 hab/km², sendo o maior número de habitantes registado nas freguesias de Santo António (27 383 hab) e São Martinho (26 482 hab) (Anexo 2). Não foi possível obter o número real de cães residentes na cidade do Funchal, no entanto e recorrendo ao critério de WHO and WSPA (1990), em que a população canina pode ser estimada em 10% da população humana, e com base nos Censos de 2011 (INE 2012), estimar-se-iam 11 200 cães residentes na cidade do Funchal. Por sua vez, de acordo com a notícia avançada pelo jornal regional Diário de Notícias, a 28 de Novembro de 2017, presume-se que este número seja superior, sendo estimado a presença de 18 000 cães conforme os levantamentos a decorrer pela Câmara Municipal do Funchal (Gonçalves 2017).

5.1.1. Caracterização do clima

O clima da Madeira mostra traços típicos de um clima mediterrâneo, com verões quentes e secos, e invernos suaves e húmidos. No entanto a cidade do Funchal, assim como a ilha da Madeira, devido à sua orografia e posição geográfica apresentam uma marcada amenidade climática (Fernandes 2009). O valor médio da temperatura do ar na cidade do Funchal é de 19°C; em Agosto (mês mais quente) é 22,6°C e em Fevereiro (mês mais frio) é 16,1°C (IPMA 2019). O valor médio anual de precipitação no Funchal é de 553 mm, sendo os meses mais chuvosos Janeiro e Dezembro, e os meses mais secos, Julho e Agosto (IPMA 2019). No período de recolha das amostras, entre 16 de Dezembro de 2015 e 27 de Abril de 2016, de acordo com os gráficos de observação dos valores diários do IPMA, verificaram-se temperaturas médias do ar superiores ao normal e níveis de precipitação inferiores para o esperado na época (IPMA 2015-2016).

5.2. Caracterização da população amostrada

A população alvo deste estudo foram os cães habitantes no Funchal, dentro destes, foram recolhidas amostras em dois grupos distintos. Um grupo composto por cães com detentor e outro com cães residentes em associações ou canis.

No primeiro grupo, reuniram-se as amostras provenientes de cães com detentor, quer de clientes da clínica Vetmedis, de cães em visitas profiláticas, como de detentores particulares, que souberam do estudo e estavam dispostos a participar. Realizou-se uma amostragem por conveniência, com a recolha de 37 amostras fecais e 10 amostras de sangue em diferentes animais. Durante a recolha das amostras fecais, neste grupo em exclusivo, foi entregue um pequeno inquérito ao detentor, de modo a caracterizar o animal, o plano de desparasitação e o estilo de vida. Nos animais em que se recolheu sangue, previamente

realizou-se um exame físico, com a caracterização do animal (sexo, grupo etário, porte do animal e condição corporal) e a observação ou não de ectoparasitas. A idade dos animais, de modo a manter uma homogeneidade nos grupos foi dividida em quatro conjuntos: animais em crescimento (até 1 ano), jovens adultos (1 a 2 anos), adultos (3 a 7 anos) e séniores (mais de 7 anos). O porte dos animais foi dividido em pequeno, médio e grande. A condição corporal foi avaliada com base na escala de 1 a 5 (Sanderson 2010).

No segundo grupo de cães, reuniram-se as amostras obtidas de cães residentes numa associação, na Sociedade Portuguesa dos Animais Domésticos (SPAD), e residentes no Canil Municipal do Funchal, também conhecido por Canil do Vasco Gil (CVG). Foi também realizada uma amostragem de conveniência, em que as amostras foram selecionadas pelo fácil acesso e não por um processo aleatório (Gouveia de Oliveira 2014). Foram recolhidas 99 amostras fecais e 49 amostras de sangue em diferentes animais. Na SPAD foram recolhidas 40 amostras fecais, sendo que 12 destas amostras correspondem a um único animal (*box* individual) alocados nas zonas de tratamento e quarentena, 4 correspondem a *boxes* de maternidade, com a mãe e respectivos cachorros, e 24 amostras correspondem a uma *box* com 3 a 5 animais, denominadas como *boxes* da zona da ribeira. Neste grupo foram ainda recolhidas 6 amostras de sangue, provenientes dos animais alojados em *box* individual na zona do internamento ou quarentena. No CVG foram recolhidas 59 amostras fecais, em que cada amostra corresponde a uma *box* com 3 a 5 animais; foram igualmente recolhidas 43 amostras de sangue. Prévio à colheita de sangue, e igualmente ao procedimento realizado com o grupo de cães com detentor, foi realizado um breve exame físico, a caracterização do animal e a detecção de ectoparasitas. A idade dos animais neste grupo foi estimada de acordo com vários factores (dentição, tamanho corporal, presença de pelagem branca típica dos animais séniores) e foi categorizada pelos quatro grupos etários, já descritos para o grupo anterior. A equipa gestora da sociedade e do canil disponibilizou informação actualizada com a identificação de cada animal (através da *box* e cor da pelagem) e indicação da data de desparasitação interna e vacinação.

5.2.1. Sociedade Protectora dos Animais Domésticos (SPAD)

A Sociedade Protectora dos Animais Domésticos do Funchal (SPAD) é uma instituição privada sem fins lucrativos, instituída a 30 de Março de 1897 e classificada como a terceira associação zoófila de Portugal. Está localizada na freguesia de Santa Luzia, na Rua do Matadouro nº10, 9050-100 Funchal; e inserida em perímetro urbano, ladeada por edifícios de habitação e uso comercial (Anexo 3). As suas instalações estão divididas num canil/gatil, num centro de atendimento médico veterinário e numa secção de venda de produtos.

No canil da SPAD existem 24 *boxes* para cães adultos, 6 *boxes* de quarentena e 8 *boxes* de tratamento, traduzindo-se numa capacidade total de 90 cães. Dependendo do

tamanho e do nível de socialização dos cães esta capacidade poderá ser aumentada. De acordo com o ficheiro disponibilizado pela equipa gestora, a SPAD albergava 130 cães e 48 gatos no momento da recolha das amostras.

Os animais à chegada são alvo de uma rigorosa profilaxia sanitária, com realização de um exame clínico e as análises necessárias; são desparasitados e vacinados, e é realizado o reforço 3 semanas depois (desconhecem-se os produtos comerciais utilizados). À entrada são ainda testados para a presença de microfilárias, com recurso à técnica de Knott, e em caso negativo iniciam prevenção com Ivertin® (ivermectina).

A 23 de Março de 2005, a Câmara Municipal do Funchal, estabeleceu um acordo com a SPAD, tendo-lhe sido atribuída a gestão do Canil Municipal do Funchal. Este acordo encontrava-se em vigor no período de recolha das amostras. É de referir que todas as fêmeas gestantes e as ninhadas, estavam alojados nas instalações da SPAD, dado não existirem as condições necessárias no Canil (SPAD 2012-2019).

5.2.2. Canil Municipal do Funchal (Canil do Vasco Gil - CVG)

O Canil do Vasco Gil (CVG) está localizado na freguesia de Santo António, no sítio do Vasco Gil, 9020 Funchal. As instalações encontram-se em zona montanhosa, ladeadas por floresta e afastadas da população (Anexo 3). O canil está dividido em duas zonas, na zona mais baixa possui um edifício de apoio ao canil e aos seus trabalhadores, e um parque com 8 *boxes* colectivas, na zona mais alta detém outras 53 *boxes*. De acordo com o ficheiro disponibilizado pela equipa gestora, o CVG albergava 208 cães no momento da recolha das amostras. Uma vez que o CVG se encontrava sob a gestão da SPAD, o procedimento de desparasitação e vacinação dos animais era igual.

5.3. Inquérito realizado no grupo de cães com detentor aquando da recolha das amostras fecais

Durante a recolha das amostras fecais em cães com detentor, foi entregue um pequeno inquérito (anexo 4) no qual procurou-se definir a freguesia de residência, a idade (grupo etário), porte, sexo, raça e condição corporal. Averiguou-se o plano de desparasitação externo e interno. Investigou-se possíveis factores de risco como a co-habitação intra-espécie e interespécies, e o estilo de vida (com acesso à rua ou a jardins/parques/espacos partilhados com outros animais). Por fim, inquiriu-se sobre o tipo de alimentação (ração comercial, comida caseira cozinhada ou com algum outro tipo de alimentação que acarrete mais riscos parasitológicos, como por exemplo as, recentemente populares, dietas com alimentos crus).

5.4. Recolha, transporte e acondicionamento das amostras

As amostras fecais foram recolhidas a partir do solo, sendo que no caso de *boxes* com vários animais, foram colhidas porções de todas amostras presentes, de modo a permitir uma

maior amostragem e uma melhor caracterização de todos os animais naquela unidade. As amostras foram acondicionadas em sacos de plástico transparente, identificadas com a data, local de recolha e identificação do animal ou *box*. As amostras foram transportadas em mala isotérmica para a clínica Vetmedis, onde foram armazenadas a uma temperatura de 4 °C, até posterior transporte para processamento.

A colheita de sangue foi realizada na veia cefálica com material esterilizado, recolhendo-se cerca de 4 ml de sangue a cada animal. Colocou-se 2 ml em tubos com EDTA e 2 ml em tubos secos, identificados com a data, local de recolha e identificação do animal. Na clínica Vetmedis os tubos com sangue em EDTA foram armazenados refrigerados a 4°C e os tubos secos foram centrifugados durante 12 minutos a 2500 RPM (Centrífuga PrO-VET® modelo PCV.s) para obtenção de soro, com posterior congelação a -20°C.

Posteriormente todas as amostras foram acondicionadas em malas isotérmicas, com material adequado de protecção e transportadas por avião, em Janeiro de 2016 e Abril de 2016, para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-Ulisboa.

5.5. Técnicas Laboratoriais

5.5.1. Técnicas utilizadas na análise das amostras fecais

Nas amostras fecais foram realizadas quatro técnicas coprológicas concomitantemente: técnica de flutuação pelo Método de Willis, técnica de sedimentação natural, técnica de Baermann e esfregaço fecal.

5.5.1.1. Técnica de Flutuação pelo Método de Willis

A técnica de flutuação permite a detecção de ovos de helmintes e oocistos de protozoários, ao basear-se no princípio de que os ovos e oocistos com uma menor densidade que a solução saturada utilizada, ficarão a flutuar na superfície desta. Os ovos de nemátodes e céstodes flutuam a uma densidade específica de 1,10-1,20, e os ovos de tremátodes, mais pesados, requerem uma densidade de 1,30-1,35 (Foreyt 2001). No presente estudo utilizou-se a solução saturada de sacarose (Foreyt 2001) com o objectivo de detectar os ovos de nematodes e céstodes, e os oocistos de protozoários. Para a execução da técnica recorreu-se ao método adaptado de Taylor et al. (2016) discriminado no anexo 5. Observou-se ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40 na ampliação de 100x, para detecção dos parasitas, e 400x, para diferenciação e medição dos mesmos (ocular de 10x e objectiva de 10x e 40x, respectivamente)

5.5.1.2. Técnica de Sedimentação Natural

Com base no princípio anteriormente descrito, os ovos com uma densidade superior à solução utilizada, sedimentam no fundo do tubo de ensaio (Taylor et al. 2016). Com esta técnica procuram-se ovos de tremátodes e recorreu-se ao método adaptado de Taylor et al.

(2016) especificado no anexo 5. Realizou-se esta técnica em simultâneo com a técnica de flutuação, com recurso aos mesmos tubos de ensaio, uma vez que os primeiros passos são comuns a ambas as técnicas. Aquando da observação do sedimento ao microscópio, adicionou-se uma gota do corante azul de metileno para facilitar a visualização, dado que este cora todos os detritos e componentes fecais de azul, excepto os ovos, que mantêm uma coloração amarelada, uma vez que as suas paredes, desde que íntegras, não absorvem o corante (Santos, 2013). Observou-se o sedimento ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40 com a ampliação de 100x (ocular de 10x e objectiva de 10x)

5.5.1.3. Técnica de Baermann

A técnica de Baermann destinou-se a recolher larvas no estado L1 de nemátodes pulmonares. A técnica baseia-se no hidro e termotropismo positivo das larvas e na incapacidade destas em nadar contra a gravidade. O calor e a humidade estimulam a mobilidade das larvas e estas saem das fezes, acabando por afundar e concentrar-se na base do tubo (Alho et al. 2013; Bowman 2014). Para a realização da técnica, recorreu-se à adaptação sugerida por Taylor et al. (2016) com recurso a um copo cónico e executaram-se os passos de acordo com o estipulado no anexo 5. Observou-se a preparação ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40 na ampliação de 100x (ocular de 10x e objectiva de 10x).

5.5.1.4. Esfregaço fecal corado pelo método de Ziehl-Neelsen modificado

O esfregaço fecal é uma técnica simples e rápida, que permite a detecção de protozoários. Uma vez que esta técnica só analisa uma pequena porção de fezes a eficácia é limitada; um resultado negativo é inconclusivo, mas um resultado positivo é tão válido como os resultados obtidos em técnicas mais eficientes com concentração (Bowman 2014).

Para a realização do esfregaço, após homogeneização da amostra, recolheu-se uma pequena porção com o auxílio de uma vareta de vidro e realizando movimentos rotativos distribuiu-se uma camada homogénea por toda a lâmina. Deixou-se secar ao ar livre durante 24 horas e iniciou-se a coloração de Ziehl-Neelsen adaptada de Casemore et al. (1985), conforme os passos indicados no anexo 5. Observou-se no microscópio óptico Olympus® modelo BX40 com óleo de imersão na ampliação de 1000x (ocular de 10x e objectiva de 100x). Seguiu-se o método de observação em ziguezague, de cima para baixo e da esquerda para a direita, sempre com início na periferia, tendo sido predefinida a observação de 50 campos por cada esfregaço.

5.5.2. Técnicas utilizadas na análise das amostras sanguíneas

Nas amostras sanguíneas foram realizadas três técnicas laboratoriais. No sangue com EDTA foram realizadas duas técnicas morfológicas: a técnica de Knott modificada e um esfregaço de sangue. No soro foi realizado a técnica serológica: imunofluorescência indirecta (IFI) para detecção de anticorpos para quatro hemoparasitas.

5.5.2.1. Técnica de Knott modificada

A técnica de Knott modificada é um método de concentração sensível e específico em cães, e que permite a diferenciação de diferentes espécies de microfilárias (Magnis et al. 2013). As amostras foram submetidas ao processo sugerido pela ESDA (2017) e descrito no anexo 5. Para diferenciação das microfilárias analisaram-se as características morfológicas e morfométricas de acordo com os parâmetros de Magnis et al. (2013). Examinou-se ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40, a preparação em duplicado, primeiro com uma ampliação de 100x, para detecção de microfilárias, e de seguida com uma ampliação de 400x, para diferenciação (ocular de 10x e objectiva de 10 e 40x, respectivamente).

5.5.2.2. Esfregaço de sangue corado pelo método de Giemsa

O esfregaço de sangue é comumente utilizado para a observação e diagnóstico de infecção por hemoparasitas (Bowman 2014). A partir do sangue com EDTA efectuaram-se dois esfregaços por cada amostra e posteriormente procedeu-se à coloração de um dos esfregaços pelo método de Giemsa, armazenando o segundo esfregaço como suplente. Para a realização do esfregaço sanguíneo e coloração pelo método de Giemsa seguiu-se o protocolo indicado no anexo 5. Depois observou-se o esfregaço ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40, primeiro numa ampliação de 400x (ocular de 10x e objectiva de 40x) para pesquisar rapidamente a presença de *Hepatozoon* spp., dado a sua dimensão assim o permitir, e de seguida na ampliação de 1000x (ocular de 10x e objectiva de 100x) para uma avaliação detalhada e pesquisa dos demais hemoparasitas. Predefiniu-se a observação de 50 campos por cada esfregaço sanguíneo.

5.5.2.3. Pesquisa de anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Babesia canis*, anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Rickettsia conorii* pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI)

Recorreu-se à técnica de imunofluorescência indirecta (IFI) para pesquisa de anticorpos (Ac) para quatro hemoparasitas. Utilizaram-se quatro kits comerciais do laboratório Megacor® (Megacor® Diagnostik GmbH, Hörbranz, Áustria) para *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*, de acordo com as instruções do fabricante exposto no anexo 5. Para três dos hemoparasitas foram analisadas as 59 amostras, mas na detecção de anticorpos caninos anti-*Babesia canis* apenas se analisaram 57 amostras, devido à quantidade insuficiente de soro em duas amostras.

Para cada kit comercial, considerou-se o limiar de positividade recomendado pelo laboratório fabricante e conforme o indicado na Tabela 5. Os limiares de positividade considerados indicam-nos um reflexo de uma infecção, num tempo indeterminado.

Tabela 5 - Kits comerciais utilizados na técnica de IFI e respectivos limiares de positividade

Kit comercial	Limiar de positividade
MegaFLUO® <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	diluição de 1:50
MegaFLUO® <i>Babesia canis</i>	diluição de 1:20
MegaFLUO® <i>Ehrlichia canis</i>	diluição de 1:40
MegaFLUO® <i>Rickettsia conorii</i>	diluição de 1:64

Observou-se as lâminas ao Microscópio de Fluorescência Olympus® modelo BX50F, numa ampliação de 400x (ocular de 10x e objectiva de 40x), comparando cada pocilho com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos pocilhos de controlo Positivo e Negativo.

Para a detecção de Ac anti-*Ehrlichia canis*, o kit MegaFLUO® *Ehrlichia canis* tem como limitações o facto desta espécie estar proximamente relacionada à *Ehrlichia ewingii* e *Ehrlichia chaffeensis*, geneticamente e antigenicamente, tornando a diferenciação destes agentes por IFI ou ELISA, sem isolamento por cultura ou PCR, problemática (Irwin 2007; CVBD 2019).

5.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados com recurso ao programa Excel® 2016. Utilizou-se a ferramenta Epi Tools® (<http://epitools.ausvet.com.au>) para estimar as prevalências parasitárias e calcular o intervalo de confiança (IC) de 95% pelo método de *Wilson*. Os cálculos de prevalência apresentados tratam-se de prevalências aparentes, em que foi pressuposto uma sensibilidade e especificidade de 1.

Ainda com recurso à ferramenta online Epi Tools® determinou-se a existência de relações estatisticamente significativas entre as prevalências parasitárias observadas e factores, como por exemplo, pertencerem a detentores ou residirem em associações/canis. Para este efeito foi realizado o teste do Qui-Quadrado de Pearson (χ^2), tendo sido considerados estatisticamente significativos os resultados em que o valor-*p* foi inferior a 0,05.

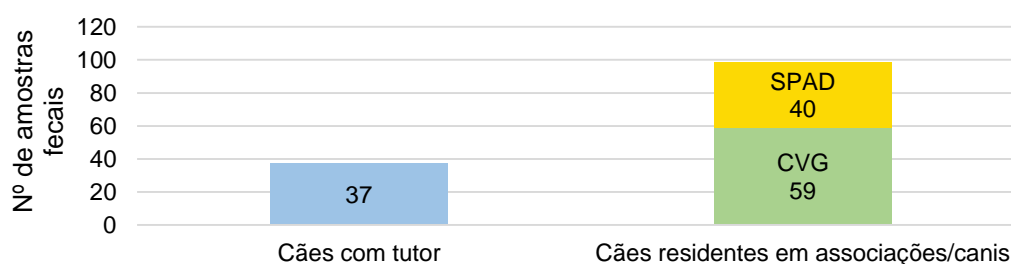
6. RESULTADOS

6.1. Resultados das Amostras Fecais

6.1.1. Caracterização das amostras fecais e da população amostrada

Foram recolhidas 136 amostras fecais em dois grupos distintos: 27,2% (37/136) das amostras foram provenientes do grupo de cães com detentor e 72,8% (99/136) dos cães residentes em associações/canis, repartidas por 43,4% (59/136) de amostras oriundas do CVG e 29,4% (40/136) da SPAD (Gráfico 1). A distribuição das amostras fecais e respectivos resultados obtidos estão esquematizados no anexo 6.

Gráfico 1 - Distribuição das amostras fecais por grupo de origem e local de recolha (n=136)



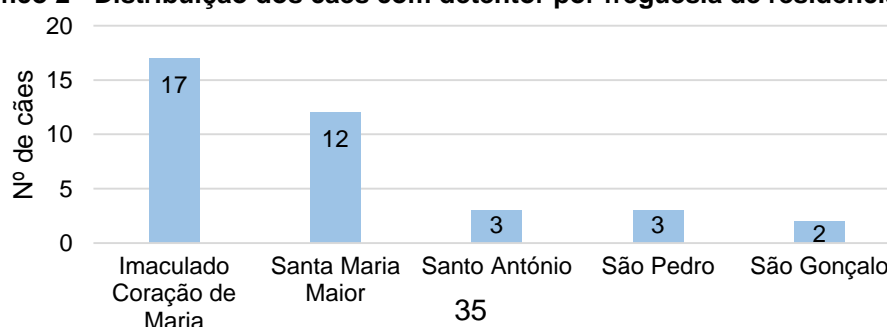
No grupo de cães provenientes de associações/canis, a maioria das amostras recolhidas avalia uma *box* com vários animais, assim não é possível estabelecer uma relação com cada animal. Pelo contrário, no grupo de cães com detentor, cada amostra representa um único animal e uma vez que cada detentor respondeu a um breve inquérito aquando da recolha, serão de seguida apresentados os resultados dos mesmos.

As amostras representam a colheita de apenas um dia e todas possuíam um aspecto macroscópico normal, não tendo sido detectados parasitas no exame macroscópico.

6.1.1.1. Caracterização da população de cães com detentor através dos resultados do inquérito realizado aquando da recolha das amostras fecais

Os resultados dos inquéritos encontram-se esquematizados no anexo 7. Através destes, aferiu-se que a maioria dos cães com detentor residia na freguesia do Imaculado Coração de Maria (46%, 17/37) e na freguesia de Santa Maria Maior (32,4%, 12/37); os restantes cães estavam distribuídos pela freguesia de Santo António (8,1%, 3/37), freguesia de São Pedro (8,1%, 3/37) e freguesia de São Gonçalo (5,4%, 2/37). Neste grupo obteve-se amostras de cães residentes em cinco das dez freguesias do Funchal.

Gráfico 2 - Distribuição dos cães com detentor por freguesia de residência (n=37)



Neste grupo 51,4% (19/37) eram fêmeas e 48,6% (18/37) eram machos (Gráfico 3). Na sua maioria eram animais adultos (48,7%, 18/37) e sêniores (29,7%, 11/37), em minoria estavam os jovens adultos (13,5%, 5/37) e os cães em crescimento (8,1%, 3/37) (Gráfico 4).

Gráfico 3 - Distribuição dos cães com detentor por sexo (n=37)

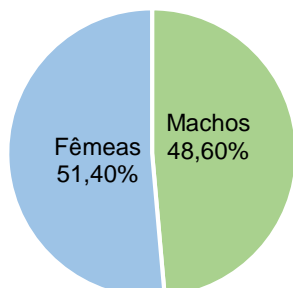
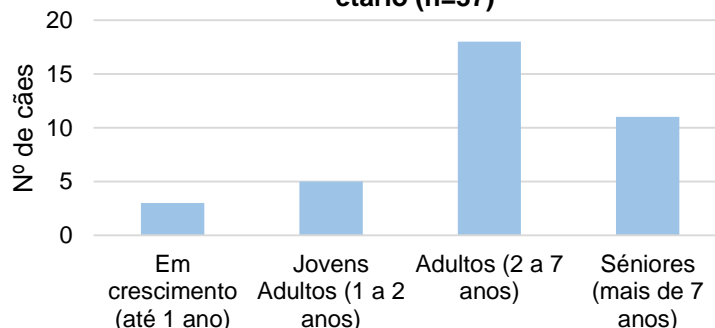


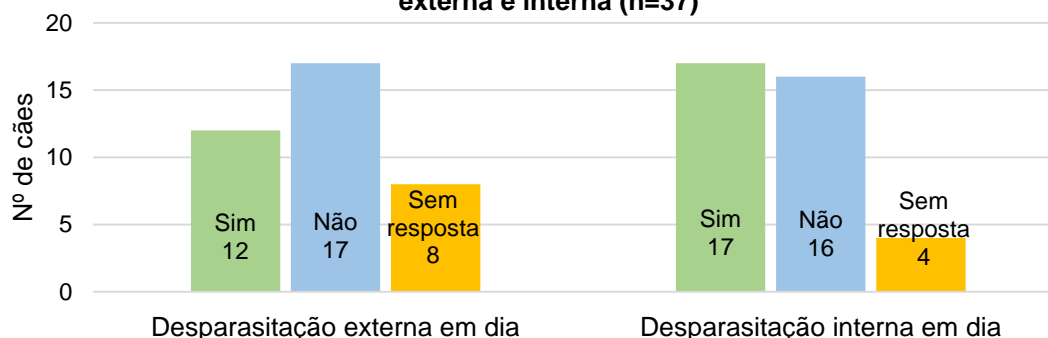
Gráfico 4 - Distribuição dos cães com detentor por grupo etário (n=37)



A maioria das amostras (62%, 23/37) foram provenientes de cães sem raça definida (SRD) e as restantes 38% (14/37) pertenciam a cães de raça pura, distribuídas por: Labrador retriever (5/37), Caniche Toy (2/37), Basset hound (1/37), Boxer (1/37), Dálmata (1/37), Grand Danois (1/37), Jack Russel (1/37), Leão da Rodésia (1/37) e Teckel (1/37).

No inquérito os detentores foram questionados sobre a desparasitação externa e interna, se esta se encontrava em dia; neste parâmetro, o critério sim foi assumido mesmo que o proprietário não conseguisse precisar a data da desparasitação. Observou-se que 32% (12/37) tinham a desparasitação externa em dia, 46% (17/37) não e em 22% (8/37) não se obteve resposta. Para a desparasitação interna, 46% (17/37) dos animais estavam com o plano em dia, 43% (16/37) não e para 11% (4/37) dos animais não se obteve resposta.

Gráfico 5 - Distribuição dos cães com detentor de acordo com os hábitos de desparasitação externa e interna (n=37)



Dos 37 animais, 81% (30/37) habitavam na mesma casa com outro cão, 16,2% (6/37) era o único animal na casa e não se obteve resposta para um dos animais (1/37) (Gráfico 6). Ainda na co-habitação, mas desta vez interespecies: 38% (14/37) habitavam na mesma casa com outras espécies, em que os 14 partilhavam a casa com gatos e destes, três ainda partilhavam o espaço com porquinhos da índia; 60% (22/37) dos cães com detentor não conviviam com outras espécies; e não se obteve resposta em um dos inquéritos (1/37) (Gráfico 7).

Gráfico 6 - Distribuição dos cães com detentor e co-habitação intra-espécie (n=37)

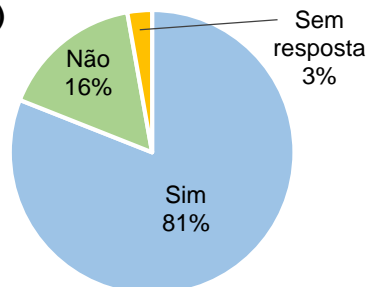
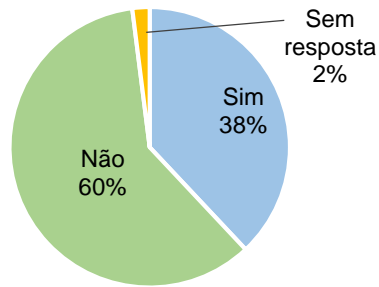


Gráfico 7 - Distribuição dos cães com detentor e co-habitação interespécie (n=37)



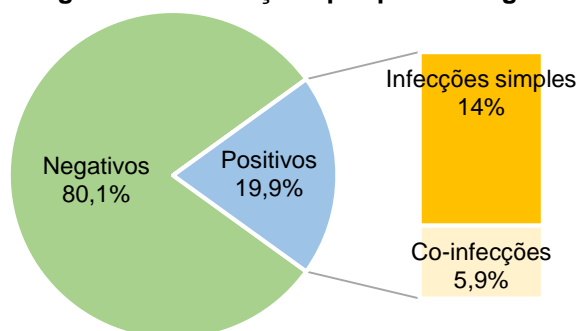
Os detentores quando questionados se os seus animais tinham acesso a espaços públicos, como jardins ou parques partilhados por outros cães, 16,2% (6/37) afirmaram que sim, 81% (30/37) não e não se obteve resposta para um dos animais (1/37).

Por fim, no inquérito investigou-se os hábitos alimentares, aqui os detentores indicaram que 21,6% (8/37) dos animais eram alimentados exclusivamente com ração comercial, 8,1% (3/37) exclusivamente com comida caseira cozinhada e a larga maioria, 59,5% (22/37), eram alimentados tanto com ração como com comida caseira cozinhada; em dois inquéritos não se obteve resposta (2/37).

6.1.2. Resultados globais dos parasitas gastrointestinais

Neste estudo detectou-se uma prevalência parasitária global de 19,9% (27/136) [IC 95%: 14%-27,3%], repartida em 14% (19/136) [IC 95%: 9,1%-20,8%] de infecções simples e 5,9% (8/136) [IC 95%: 3,0%-11,2%] de infecções mistas por dois agentes.

Gráfico 6 - Prevalência global das infecções por parasitas gastrointestinais (n=136)



Nas infecções simples o agente parasitário predominante foi *Giardia* spp. com uma prevalência de 6,6% (9/136) [IC 95%: 3,5%-12,1%], seguido de *T. canis* com 3,7% (5/136) [IC 95%: 1,6%-8,3%]. As restantes infecções simples foram provocadas pelos agentes *Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora* spp., e *U. stenocephala*, em que cada parasita apresentou uma prevalência de 0,7% (1/136) [IC 95%: 0,1%-0,4%].

Nas co-infecções verificaram-se cinco combinações de agentes parasitários, que se encontram detalhadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Co-infecções observadas na pesquisa de parasitas gastrointestinais e respectiva frequência absoluta, prevalência e IC 95% (n=7)

Co-infecções	Frequência absoluta (n)	Prevalência (%) [IC 95%]
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0,7% [0,1-0,4]
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cystoisospora</i> spp.	2	1,5% [0,4-5,2]
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>T. canis</i>	2	1,5% [0,4-5,2]
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>U. stenocephala</i>	1	0,7% [0,1-0,4]
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>T. canis</i>	1	0,7% [0,1-0,4]

6.1.3. Resultados por técnica coprológica

6.1.3.1. Parasitas observados na técnica de flutuação pelo método de Willis

Na técnica de flutuação foram detectadas 8,8% (12/136) [IC 95%: 5,1% - 14,8%] das amostras com pelo menos um parasita. A prevalência de infecções simples foi de 6,6% (9/136) [IC95%: 3,5%-12,1%] e a prevalência de co-infecções foi 2,2% (3/136) [IC 95%: 0,8%-6,3%].

Na flutuação duas amostras revelaram presença de ovos do tipo ancilostomatídeo. Estes foram medidos, com recurso ao microscópio óptico Olympus® modelo BX50F, com ocular micrométrica, para aferir a que espécie pertenciam. O comprimento dos ovos variou entre 70 a 80 µm (média: 73,8 µm) e a largura entre 47,5 e 50 µm (média: 49 µm). Através desta medição e segundo as tabelas de Thienpont et al. (1979), concluiu-se serem ovos de *Uncinaria stenocephala* (Figura 9).



Figura 9 - Ovo de *Uncinaria stenocephala* (original)

Deste modo, através da técnica de flutuação observou-se, nas infecções simples, uma prevalência de 3,7% (5/136) [IC 95%: 1,6%-8,3%] de infecções por *Cystoisospora* spp., 2,2% (3/136) [IC 95%: 0,8%-6,28%] de infecções por *T. canis* e 0,7% (1/136) [IC 95%: 0,1%-4,1%] de infecções por *U. stenocephala*. Nas co-infecções, observou-se uma prevalência de 1,5% (2/136) [IC 95%: 0,4%-5,2%] de infecções por *Cystoisospora* spp. e *T. canis*, e 0,7% (1/136) [IC 95%: 0,1%-4,1%] de infecções por *Cystoisospora* spp. e *U. stenocephala*.

6.1.3.2. Parasitas observados na técnica de sedimentação natural

Na observação das 136 amostras pela técnica de sedimentação natural detectou-se 5,9% (8/136) [IC 95%: 3,0%-11,2%] de amostras positivas, com as espécies, *Cystoisospora* spp. e *Toxocara canis*, quer em situações de infecções simples como co-infecções. Detectou-se 4,4% (6/136) [IC 95%: 2,0%-9,3%] de infecções simples, distribuídas por 3,7% (5/136) [IC 95%: 1,6%-8,3%] de infecções por *T. canis* e 0,7% (1/136) [IC 95%: 0,1%-4,1%] de infecções por *Cystoisospora* spp.; e 1,5% (2/136) [IC 95%: 0,4%-5,2%] de co-infecções por *Cystoisospora* spp. e *T. canis*. No entanto, das 8 amostras positivas através desta técnica, em 5, os parasitas já tinham sido observados na técnica de flutuação, mas nos outros 3 casos, detectou-se infecções simples por *T. canis*, que anteriormente não haviam sido observadas.

6.1.3.3. Parasitas observados na técnica de Baermann

Não foram observadas larvas de parasitas pulmonares em nenhuma das 136 amostras analisadas.

6.1.3.4. Parasitas observados no esfregaço fecal

Na observação dos esfregaços fecais foram identificados quistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 11% (15/136) [IC 95%: 6,8%-17,4%] das amostras. Das amostras positivas, 9,6% (13/136) [IC 95%: 5,7%-15,7%] tratavam-se de infecções simples: em que se observou uma prevalência de 8,1% (11/136) [IC 95%: 4,6%-13,9%] de infecções por *Giardia* spp. e 1,5% (2/136) [IC 95%: 0,4%-5,2%] de infecções por *Cryptosporidium* spp. Nas co-infecções, por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., detectou-se uma prevalência de 1,5% (2/136) [IC 95%: 0,4%-5,2%].

6.1.4. Resultados dos exames coprológicos por grupo de origem de recolha

6.1.4.1. Grupo de cães com detentor

No grupo de cães com detentor detectou-se que 27% (10/37) [IC 95%: 15,4%-42,9%] dos animais encontravam-se parasitados, por um ou mais agentes. Observou-se uma prevalência de 16,2% (6/37) [IC 95%: 7,7%-31,1%] de infecções simples e 10,8% (4/37) [IC 95%: 4,3%-24,7%] de co-infecções (Gráfico 9).

As infecções simples encontravam-se distribuídas por 10,8% (4/37) [IC 95%: 4,3%-24,7%] de infecções por *Giardia* spp., 2,7% (1/37) [IC 95%: 0,5%-13,8%] por *Cryptosporidium* spp. e 2,7% (1/37) [IC 95%: 0,5%-13,8%] por *U. stenocephala*. As co-infecções estavam distribuídas por uma prevalência de 5,4% (2/37) [IC 95%: 1,5%-17,7%] de co-infecções com *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., 2,7% (1/37) [IC 95%: 0,5%-13,8%] de infecções mistas por *T. canis* e *Cryptosporidium* spp. e por fim uma prevalência de 2,7% (1/37) [IC 95%: 0,5%-13,8%] de co-infecção por *Giardia* spp. e *Cystoisospora* spp. (Gráfico 8).

Gráfico 7 - Prevalência das infecções gastrointestinais nos cães com detentor (n=37)

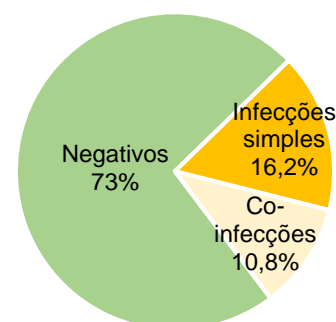
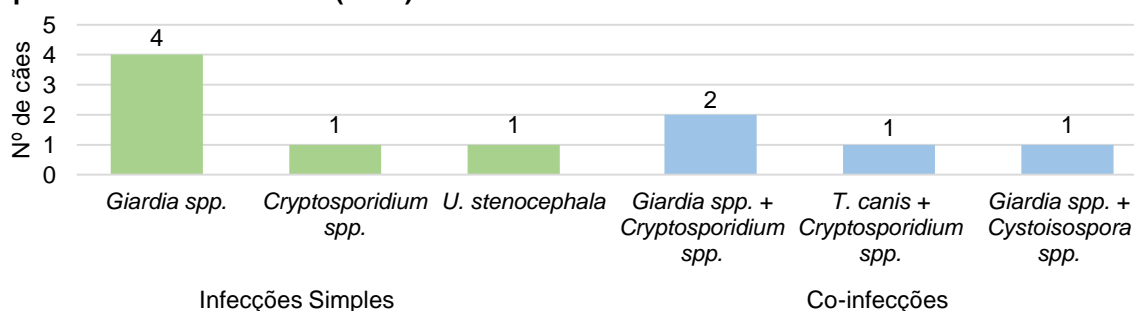


Gráfico 8 - Distribuição das infecções simples e co-infecções e tipo de parasita observado no grupo de cães com detentor (n=10)



Por parasita, no grupo de cães com detentor, observou-se uma prevalência de 32,4% (12/37) [IC 95%:19,6%-48,5%] de protozoários, repartidos por 18,9% (7/37) [IC 95%: 9,5%-34,2%] de *Giardia* spp., 10,8% (4/37) [IC 95%: 4,3%-24,7] de *Cryptosporidium* spp. e 2,7% (1/37) [IC 95%: 0,5%-13,8%] de *Cystoisospora* spp.; e uma prevalência de 5,4% (2/37) [IC 95%: 1,5%-17,7%] de nemátodes, distribuída por uma prevalência de 2,7% (1/37) [IC 95%: 0,5%-13,8%] de *T. canis*, e de 2,7% (1/37) [IC 95%: 0,5%-13,8%] de *U. stenocephala*.

6.1.4.2. Grupo de cães residentes em associações/canis

No grupo de cães residentes em associações/canis detectou-se 17,2% (17/99) [IC 95%: 11%-25,8%] de animais parasitados, por um ou mais agentes. Neste grupo observou-se uma prevalência de 13,2% (13/99) [IC 95%: 7,8%-21,2%] de infecções simples e uma prevalência de 4% (4/99) [IC 95%: 1,6%-9,9%] de co-infecções (Gráfico 11).

As infecções simples estavam distribuídas por 5,1% (5/99) [IC 95%: 2,2%-11,3%] de infecções por *Giardia* spp., 5,1% (5/99) [IC 95%: 2,2%-11,3%] de infecções por *T. canis* e 3% (3/99) [IC 95%: 1%-8,5%] de infecções por *Cystoisospora* spp. As co-infecções estavam repartidas por uma prevalência de 2% (2/99) [IC 95%: 0,6%-7,1%] de co-infecções por *Cystoisospora* spp. e *T. canis*, 1% (1/99) [IC 95%: 0,2%-5,5%] de infecções mistas por *Cystoisospora* spp. e *U. stenocephala* e por fim uma prevalência de 1% (1/99) [IC 95%: 0,2%-5,5%] de co-infecção por *Cystoisospora* spp. e *Giardia* spp.

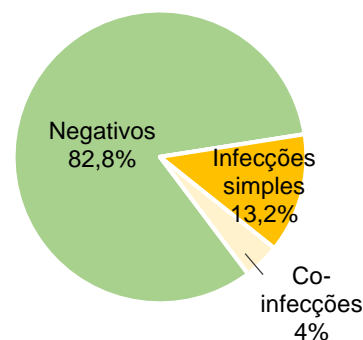
Por parasita, no grupo de cães residentes em associações/canis, observou-se uma prevalência de 13,1% (13/99) [IC 95%: 7,8%-21,2%] de protozoários, repartidos por uma prevalência de 6% (6/99) [IC 95%: 2,8%-12,6%] de *Giardia* spp. e 7,1% (7/99) [IC 95%: 3,4%-13,9%] de *Cystoisospora* spp.; e uma prevalência de 8,1% (8/99) [IC 95%: 4,2%-15,1%] de nemátodes, distribuída por uma prevalência de 7,1% (7/99) [IC 95%: 3,4%-13,9%] de *T. canis*, e de 1% (1/99) [IC 95%: 0,2%-5,5%] de *U. stenocephala*.

6.1.4.2.1. Grupo de cães residentes na SPAD

Analisando individualmente os cães residentes em associações/canis, consoante o local de recolha, observou-se que na SPAD, 35% (14/40) [IC 95%: 22,1%-50,5%] das amostras estavam parasitadas, repartidas por 25% (10/40) [IC 95%: 14,2%-40,2%] de infecções simples e 10% (4/40) [IC 95%: 3,9%-23,1%] de co-infecções por dois agentes.

As infecções simples encontravam-se distribuídas por 10% (4/40) [IC 95%: 3,9%-23,1%] de infecções por *T. canis*, 7,5% (3/40) [IC 95%: 2,6%-19,9%] por *Cystoisospora* spp. e 7,5% (3/40) [IC 95%: 2,6%-19,9%] por *Giardia* spp. As co-infecções estavam repartidas por

Gráfico 9 - Prevalência das infecções gastrointestinais nos cães residentes em associações/canis (n=99)



uma prevalência de 5% (2/40) [IC 95%: 1,4%-16,5%] de co-infecções por *Cystoisospora* spp. e *T. canis*, 2,5% (1/40) [IC 95%: 0,4%-12,9%] de infecções mistas por *Cystoisospora* spp. e *U. stenocephala* e por fim uma prevalência de 2,5% (1/40) [IC 95%: 0,4%-12,9%] de co-infecção por *Cystoisospora* spp. e *Giardia* spp.

Na SPAD, dentro das 14 (14/40) amostras positivas, oito pertenciam a amostras de *boxes* individuais, de animais alojados nas zonas de tratamento e quarentena, num total de 12 amostras recolhidas nestas áreas; três das amostras positivas pertenciam a *boxes* de maternidade, num total de quatro amostras recolhidas nestas *boxes*, com a mãe e respectivos cachorros; e três das amostras positivas pertenciam aos cães situados na zona da ribeira, que corresponde à zona onde a maioria dos animais estão alojados, no total de 24 amostras recolhidas nesta área. Nos animais situados nas zonas de tratamento e quarentena observou-se a presença de infecções simples (2/40) e co-infecções (4/40) por *T. canis*, *U. stenocephala*, *Cystoisospora* spp. e *Giardia* spp. Nas *boxes* de maternidade observou-se infecções simples de *Cystoisospora* spp. (2/40) e *Giardia* spp. (1/40). Nas *boxes* situadas na zona da ribeira observou-se infecções simples por *T. canis* (3/40).

Por parasita, na SPAD, observou-se uma prevalência de protozoários de 27,5% (11/40) [IC 95%: 16,1%-42,8%], distribuídos por 17,5% (7/40) [IC 95%: 8,8%-32%] de *Cystoisospora* spp. e 10% (4/40) [IC 95%: 4%-23,1%] de *Giardia* spp.; e uma prevalência de 17,5% (7/40) [IC 95%: 8,8%-32%] de nemátodes repartida por uma prevalência de 15% (6/40) [IC 95%: 7,1%-29,1] de *T. canis* e de 2,5% (1/40) [IC 95%: 0,4%-12,9%] de *U. stenocephala*.

6.1.4.2.2. Grupo de cães residentes no CVG

No CVG observaram-se 5,1% (3/59) [IC 95%: 1,7%-13,9%] das amostras parasitadas, todas correspondiam a infecções simples. Observaram-se 3,4% (2/59) [IC 95%: 0,9%-11,5%] de infecções por *Giardia* spp. e 1,7% (1/59) [IC 95%: 0,3%-9%] de infecções por *T. canis*.

6.1.5. Resultados por parasita gastrointestinal

Nas 136 amostras analisadas não foram observados parasitas da classe Cestoda. A prevalência de nemátodes detectada foi de 7,4% (10/136) [IC 95%: 4%-13%]. Em que se observou uma prevalência de 5,9% (8/136) [IC 95%: 3,0%-11,2%] de *T. canis* e uma prevalência de 1,5% (2/136) [IC 95%: 0,1%-4,1%] de *U. stenocephala*.

O grupo de parasitas com maior prevalência neste estudo foram os protozoários, com uma prevalência de 18,4% (25/136) [IC 95%: 12,8%-25,7%], distribuídos pelas espécies *Cystoisospora* spp. (5,9% (8/136) [IC 95%: 3,0%-11,2%]), *Cryptosporidium* spp. (2,9% (4/136) [IC 95%: 1,2%-7,3%]) e pela espécie com maior prevalência, *Giardia* spp. (9,6% (13/136) [IC 95%: 5,7%-15,7%]).

6.1.5.1. Associações estatísticas – infecções por parasitas gastrointestinais e factores de risco

Para os dois grupos de cães relacionou-se a sua origem e prevalência parasitária, de modo a procurar possíveis relações, assim, analisou-se uma provável dependência entre pertencerem a particulares ou de residirem em associações/canis com o estarem parasitados; e dentro do grupo de animais residentes em associações/canis investigou-se a relação entre residirem na SPAD ou no CVG (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição dos resultados dos parasitas gastrointestinais, com respectiva prevalência e significância, por grupo de origem e local de recolha (n=136)

Factor	Nº total de amostras	Nº de amostras positivas	Prevalência (%) [IC 95%]	Associação estatística
Grupo de origem	Cães com detentor	37	10	27 [15,4-42,9]
	Cães residentes em associações/canis	99	17	17,2 [11-25,8]
	SPAD	40	14	35 [22,1-50,5]
	CVG	59	3	5,1 [1,7-13,9]

Note: The statistical association values (χ², g.l., p) are provided for the comparisons between 'Cães com detentor' and 'Cães residentes em associações/canis', and between 'SPAD' and 'CVG' within the 'Cães residentes em associações/canis' group.

Na análise entre o grupo de origem dos cães e estes estarem parasitados ou não, não se verificou uma relação estatisticamente significativa ($\chi^2=1,083$; g.l.=1; $p=0,298$). No entanto na análise da relação entre os cães residirem na SPAD ou no CVG e estes estarem parasitados ou não, observou-se uma associação estatisticamente significativa ($\chi^2=12,9697$; g.l.=1; $p=0,0003$).

Na análise entre a origem do grupo e as espécies parasitárias detectadas, não se encontrou uma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=19,69$; g.l.=10; $p=0,032$). No anexo 8 verifica-se a distribuição dos resultados parasitários por grupo de origem. Por sua vez, foi detectada uma diferença estatisticamente significativa entre os cães residirem na SPAD ou no CVG e o tipo de infecção parasitária encontrado ($\chi^2=16,9536$; g.l.=6; $p=0,00946$); a caracterização das infecções observadas e respectiva distribuição, estão descritas na Tabela 8, por associação e canil.

Tabela 8 - Distribuição das infecções parasitárias gastrointestinais por local de recolha, dentro do grupo de residentes em associações/canis (n=99)

Resultado parasitário	Cães residentes na SPAD (n)	Cães residentes no CVG (n)	Total (n)
Negativo	26	56	82
<i>Toxocara canis</i>	4	1	5
<i>Cystoisospora</i> spp.	3	0	3
<i>Giardia</i> spp.	3	2	5
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cystoisospora</i> spp.	1	0	1
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>T. canis</i>	2	0	2
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>U. stenocephala</i>	1	0	1
Total	40	59	99

Uma vez que através dos inquéritos e localização da SPAD e CVG, se dispunha da distribuição das amostras por freguesia, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a freguesia e prevalência parasitária ($\chi^2=27,009$; g.l.=5; $p=0,00006$). Neste estudo e com a amostra alcançada, conseguiu-se avaliar 60% das freguesias que compõem o Funchal (6/10); no grupo de cães com detentor obtiveram-se amostras de 50% das freguesias, a referir: Imaculado Coração de Maria, Santa Maria Maior, Santo António, São Gonçalo e São Pedro; e no grupo de cães residentes em associações/canis obteve-se amostras da freguesia de Santo António (onde está localizado o CVG) e da freguesia de Santa Luzia (onde está localizada a SPAD). Na Tabela 9 observa-se a distribuição de amostras por freguesia.

Tabela 9 - Distribuição das amostras por freguesia de residência com respectiva prevalência parasitária e IC 95% (n=136)

Freguesia	Nº total de amostras (n)	Nº de amostras positivas (n)	Prevalência (%) [IC 95%]
Santa Luzia	40	14	35% [22-50]
Santo António	62	3	5% [2-13]
Imaculado Coração de Maria	17	3	18% [6-41]
Santa Maria Maior	12	7	58% [32-81]
São Gonçalo	2	0	0% [0-66]
São Pedro	3	0	0% [0-56]

6.1.5.2. Associações estatísticas entre os dados obtidos através dos inquéritos no grupo de cães com detentor e os resultados observados

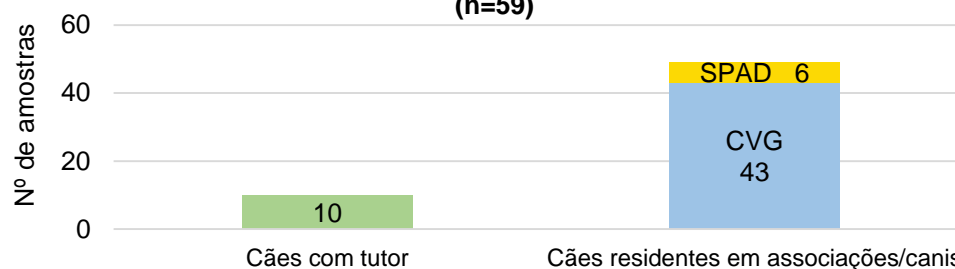
No grupo de cães com detentor, como se dispunha de mais dados a caracterizá-los, relacionou-se os resultados obtidos com os inquéritos, anteriormente expostos, e pôde-se verificar uma associação estatística ($\chi^2=9,685$; g.l.=4; $p=0,046$) entre os cães parasitados e a freguesia de residência. Não se verificou uma associação estatisticamente significativa ($p>0,05$) para os restantes factores analisados neste grupo, como o sexo, raça, faixa etária, desparasitação externa e interna em dia, co-habitação intra-espécie e interespecies, acesso a espaços públicos e o tipo de alimentação (anexo 9).

6.2. Resultados das Amostras Sanguíneas

6.2.1. Caracterização das amostras sanguíneas e população amostrada

Foram recolhidas 59 amostras sanguíneas nos dois grupos distintos: 17% (10/59) no grupo de cães com detentor e 83% (49/59) no grupo de cães provenientes de associações/canis, repartidas em 73% (43/59) provenientes do CVG e 10% (6/59) da SPAD (Gráfico 10). A distribuição das amostras sanguíneas com respectiva caracterização dos animais e resultados obtidos estão esquematizados nos anexos 10 e 11, respectivamente.

Gráfico 10 – Distribuição das amostras sanguíneas por grupo de origem e local de recolha (n=59)



Uma vez que antes da colheita do sangue, todos os animais foram submetidos a um exame prévio, pôde-se caracterizar esta população amostrada para a freguesia de residência, distribuição etária, sexo, raça, porte, observação de ectoparasitas e se cumpriam algum protocolo de profilaxia anti-parasitária. A somar à freguesia de residência dos cães com detentor e uma vez que todos os animais do CVG estavam alojados na freguesia de Santo António, e os da SPAD na freguesia de Santa Luzia, obteve-se uma distribuição de: 48 (48/59) cães residentes na freguesia de Santo António, seis (6/59) na freguesia de Santa Luzia e cinco (5/59) na freguesia de Santa Maria Maior. A população amostrada foi constituída por 55,9% (33/59) de machos e 44,1% (26/59) de fêmeas (Gráfico 14). Destes, o grupo etário com maior presença foram os adultos, com 61% (36/59), seguidos dos jovens adultos com 30,5% (18/59), em minoria foram representados os séniores, com 6,8% (4/59) e os cães em crescimento com 1,7% (1/59) (Gráfico 13).

Gráfico 12 - Distribuição dos cães amostrados por sexo (n=59)

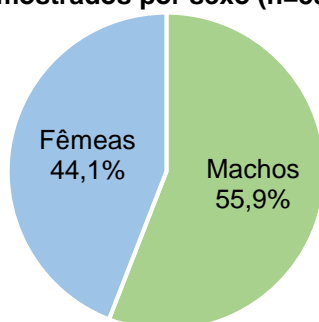
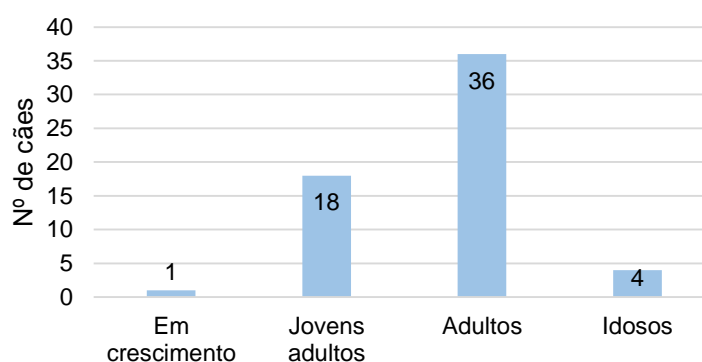


Gráfico 11 - Distribuição dos cães por grupo etário (n=59)

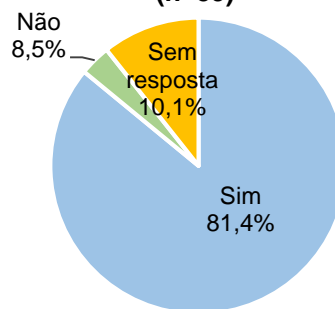


A grande maioria, 96,6% (57/59), eram cães sem raça definida e apenas 3,3% (2/59) eram de raça (Labrador retriever). A média da condição corporal dos 59 cães examinados foi de 3,2 (na escala de 1 a 5) e estavam distribuídos por 25,4% (15/59) de cães de porte pequeno, 49,2% (29/59) de cães de porte médio e por 25,4% (15/59) de cães de porte grande. Durante o exame físico, 95% (56/59) dos cães não apresentaram ectoparasitas, no entanto em 5% (3/59) observaram-se pulgas.

Quando averiguado se os cães faziam profilaxia anti-parasitária, concluiu-se que 81,4% (48/59) realizava profilaxia endoparasitocida e que 8,5% (5/59) não; em seis (6/59) animais não foi possível averiguar este factor (Gráfico 15). Na profilaxia ectoparasitocida não

se conseguiu obter dados caracterizantes, apenas um (1/59) detentor indicou que realizava a desparasitação e cinco (5/59) detentores indicaram que não; para os restantes 53 (53/59) animais não se averiguou. Destes 53, 49 eram animais residentes em associações/canis, no qual era regra a desparasitação à entrada, no entanto não houve informação do tipo e quando foi realizada. Os restantes quatro pertenciam a detentores que não sabiam informar.

Gráfico 13 - Hábitos de profilaxia endoparasitíctica (n=59)



6.2.1.1. Caracterização do grupo de cães com detentor

A população amostrada de cães com detentor corresponde a 17% (10/59) do total, sendo constituída por 10 cães. Os cães amostrados residiam na freguesia de Santo António (5/10) e na freguesia de Santa Maria Maior (5/10). Deste grupo, 80% (8/10) eram machos e 20% (2/10) fêmeas. Em relação à distribuição etária verificou-se que 50% (5/10) dos cães eram adultos, 30% (3/10) séniores e 20% (2/10) jovens adultos. Nesta população, 80% (8/10) não tinha raça definida e 20% (2/10) eram da raça Labrador retriever; o porte dos animais estava distribuído por 50% (5/10) de porte médio, 40% (4/10) de porte grande e 10% (1/10) de porte pequeno; a média da condição corporal neste grupo foi de 3,5. Em 70% (7/10) dos animais não se observaram ectoparasitas mas em 30% (3/10) observaram-se pulgas. Quando questionados sobre a realização de profilaxia endoparasitíctica, 50% (5/10) não realizava e 30% (3/10) realizava; em 20% (2/10) dos analisados desconhecia-se se era aplicada alguma profilaxia. Acerca da realização de profilaxia ectoparasitíctica apenas um dos cães realizava, ou seja, 10% (1/10), sendo que 50% (5/10) não fazia; em 40% (4/10) dos cães com detentor não se conseguiu averiguar.

6.2.1.2. Caracterização do grupo de cães residentes em associações e canis

A população amostrada residente em associações/canis tratava-se de 83% (49/59) do total da população deste estudo; em que 51% (25/49) eram machos e 49% (24/49) eram fêmeas. Destes, 2% (1/49) eram cães em crescimento, 32% (16/49) eram jovens adultos, 63,3% (31/49) adultos e por último 2% (1/49) eram séniores. Todos os animais deste grupo eram de raça indefinida. Nestes cães observou-se uma condição corporal média de índice 3 e estavam repartidos por 28,6% (14/49) de cães de porte pequeno, 49% (24/49) de porte médio e 22,4% (11/49) de porte grande. Não se observou ectoparasitas em nenhum animal; no entanto para este grupo não se conseguiu esclarecer os hábitos de profilaxia ectoparasitíctica em prática. Em relação à profilaxia endoparasitíctica, 91,8% (45/49) realizaram, contudo, em 8,2% (4/49) dos animais não se obteve informação.

6.2.1.2.1. Caracterização do grupo de cães residente na SPAD

A população residente na SPAD correspondeu a 10% (6/59) da população amostrada e era composta por cães alojados nas zonas de tratamento e quarentena. Destes, 67% (4/6) eram machos e 33% (2/6) fêmeas; o grupo etário predominante foram os jovens adultos, correspondendo a 83% (5/6) das amostras, com os restantes a pertencer a cães em crescimento, com 17% (1/6). A média da condição corporal foi de 3. A população amostrada estava repartida em 50% (3/6) de cães de porte pequeno e 50% (3/6) de cães de porte médio. Durante o exame físico não se observou ectoparasitas (0/6). Contudo, não se conseguiu clarificar qual a profilaxia ectoparasitocida praticada, apesar de se saber de antemão que era protocolo da associação a desparasitação dos animais à chegada. De acordo com a informação fornecida pela equipa gestora pôde-se averiguar que 33% (2/6) dos animais realizou profilaxia endoparasitocida no entanto, para 67% (4/6) não se conseguiu esclarecer.

6.2.1.2.2. Caracterização do grupo de cães residente no CVG

A população residente no CVG correspondeu a 73% (43/59) da população deste estudo. Destes 48,8% (21/43) eram machos e 51,2% (22/43) fêmeas; o grupo etário predominante foram os adultos, correspondendo a 72,1% (31/43), seguido dos jovens adultos com 25,6% (11/43) e uma minoria de seniores com 2,3% (1/43). A média da condição corporal foi de 3,1. A população amostrada estava repartida em 25,6% (11/43) de cães de porte pequeno, 48,8% (21/43) de cães de porte médio e 25,6% (11/43) de cães de porte grande. Durante o exame físico não se observaram ectoparasitas em nenhum dos animais (0/43). Todos os animais realizavam profilaxia contra os endoparasitas (43/43). No entanto, não foi possível esclarecer a profilaxia praticada contra os ectoparasitas.

6.2.2. Resultados globais dos parasitas hemáticos

Neste estudo, através das técnicas morfológicas observou-se 44,1% (26/59) [IC 95%: 32,2%-56,7%] dos animais com a presença de pelo menos um parasita (Gráfico 16). Através das técnicas serológicas detectou-se 73% (43/59) [IC 95%: 60,4%-82,6%] dos animais com anticorpos para pelo menos um agente patogénico (Gráfico 17).

Nos animais foram observadas 12 combinações, quer da presença de parasitas e/ou presença de Ac contra parasitas, que poderão ser analisadas no anexo 12.

Gráfico 14 - Prevalência dos hemoparasitas observados por técnicas morfológicas (n=59)

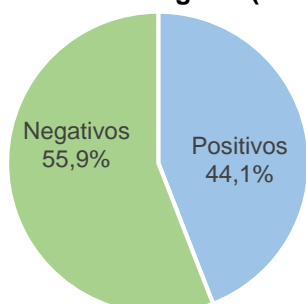
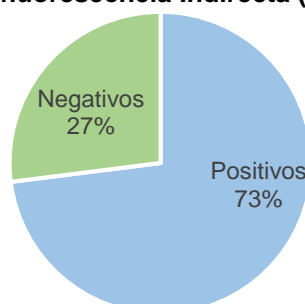


Gráfico 15 - Seroprevalência dos hemoparasitas detectados por Imunofluorescência Indirecta (n=59)



6.2.2.1. Parasitas observados por técnica laboratorial

6.2.2.1.1. Parasitas observados pela técnica modificada de Knott

Nas 59 amostras de sangue com EDTA, detectou-se um animal positivo para a presença de microfilárias. Após análise das características morfológicas e morfométricas identificou-se como microfilárias da espécie *Dirofilaria immitis*; traduzindo-se numa prevalência de 1,7% (1/59) [IC 95%: 0,3%-9,0%].

6.2.2.1.2. Parasitas observados no esfregaço sanguíneo

Na observação dos 59 esfregaços sanguíneos detectou-se a presença de microfilárias numa amostra e observou-se *Mycoplasma* spp. e *Anaplasma phagocytophilum* noutras 25 amostras; em situações de infecção simples e co-infecção. A prevalência dos hemoparasitas através da análise do esfregaço sanguíneo foi de 44,1% (26/59) [IC 95%: 32,2%-56,7%]. Destes, 40,7% (24/59) [IC 95%: 29,1%-53,4%] tratavam-se de infecções simples: onde se observou uma prevalência de 33,9% (20/59) [IC 95%: 23,1%-46,6%] de infecções por *Mycoplasma* spp., uma prevalência de 5,1% (3/59) [IC 95%: 1,7%-13,9%] por *A. phagocytophilum* e uma prevalência de 1,7% (1/59) [IC 95%: 0,3%-9,0%] por microfilárias. Detectou-se uma prevalência de co-infecções, por *A. phagocytophilum* e *Mycoplasma* spp. de 3,4% (2/59) [IC 95%: 0,9%-11,5%].

6.2.2.1.3. Resultados da técnica de Imunofluorescência Indirecta (IFI)

Através da detecção de anticorpos anti-parasitas pela técnica IFI detectou-se uma seroprevalência aparente de 73% (43/59) [IC 95%: 60,4%-82,6%] de animais positivos, a um ou a mais agentes. Observou-se uma seroprevalência de 61% (36/59) [IC 95%: 48,3%-72,4%] de animais positivos a um agente, 6,8% (4/59) [IC 95%: 2,7%-16,2%] a dois dos agentes, 3,4% (2/59) [IC 95%: 0,9%-11,5%] a três dos agentes e 1,7% (1/59) [IC 95%: 0,3%-9,0%] positivos aos quatro agentes em estudo. As combinações de agentes nos casos de co-infecção e respectiva distribuição estão representadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Co-infecções observadas na detecção de anticorpos anti-hemoparasitas através da técnica IFI e frequência absoluta de animais co-infectados (n=7)

Co-infecções	Frequência absoluta (n)
<i>Babesia canis</i> + <i>Rickettsia conorii</i>	3
<i>Ehrlichia canis</i> + <i>Rickettsia conorii</i>	1
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> + <i>Babesia canis</i> + <i>Rickettsia conorii</i>	1
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> + <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Rickettsia conorii</i>	1
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> + <i>Babesia canis</i> + <i>Ehrlichia canis</i> + <i>Rickettsia conorii</i>	1

Isolando os resultados por agente parasitário, na pesquisa de Ac anti-*A. phagocytophilum*, detectou-se uma seroprevalência aparente de 8,5% (5/59) [IC 95%: 3,7%-18,4%]. Destes 5 animais positivos, 3 também tinham Ac para outros agentes.

Recorda-se que a pesquisa de anticorpos anti-*B. canis* realizou-se em apenas 57 amostras, das 59 amostras totais. Observou-se uma seroprevalência aparente de 24,6% (14/57) [IC 95%: 15,2%-37,1%]. Nestes 14 cães com Ac anti-*Babesia canis*, 5 tinham Ac para outros agentes.

Na pesquisa de Ac anti-*Rickettsia conorii*, encontrou-se uma seroprevalência aparente de 54,2% (32/59) [IC 95%: 41,7%-66,3%]. Dos 32 animais com Ac anti-*Rickettsia conorii*, 7 tinham Ac para outros agentes.

Por fim na pesquisa de Ac anti-*Ehrlichia canis*, foram detectados 3 cães positivos, traduzindo-se numa seroprevalência aparente de 5,1% (3/59) [IC 95%: 1,7%-13,9%]. Todos os animais positivos *E. canis* possuíam Ac para outros agentes.

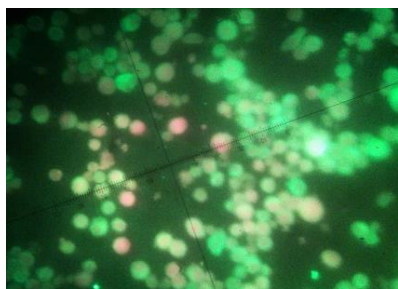


Figura 10 - Resultado de *E. canis* obtido por IFI, evidenciando o aspecto do controlo positivo (original)

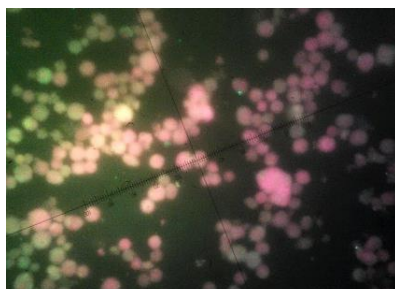


Figura 11 - Resultado de *E. canis* obtido por IFI, evidenciando o aspecto do controlo negativo (original)

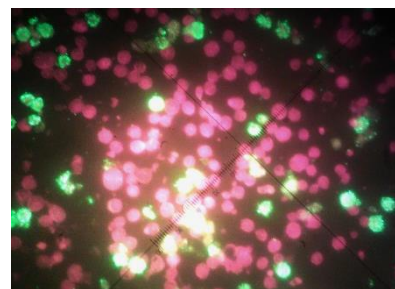


Figura 12 - Resultado de *E. canis* obtido por IFI, evidenciando o aspecto de uma amostra positiva (original)

6.2.2.2. Resultados por grupo de origem de recolha

6.2.2.2.1. Grupo de cães com detentor

O grupo de cães com detentor foi composto por dez (10/59) animais, em que 90% (9/10) [IC 95%: 59,6%-98,2%] foram positivos para os anticorpos de um dos agentes pesquisados através na técnica IFI; destes, 60% (6/10) foram positivos para Ac anti-*R. conorii* e 30% (3/10) positivos para Ac anti-*B. canis*. Não se observou animais com anticorpos para mais do que um agente, nem se detectou, no limiar de positividade considerado, animais positivos aos Ac anti-*A. phagocytophilum*, nem anti-*E. canis*.

Através das técnicas morfológicas com observação ao microscópio óptico detectou-se 50% (5/10) [IC 95%: 23,7%-76,3%] dos cães positivos, destes 10% (1/10) apresentaram microfilárias da espécie *D. immitis* e 40% (4/10) apresentaram *Mycoplasma* spp. Destes cães em que se observou a presença de um parasita, quatro evidenciaram anticorpos para outro parasita.

6.2.2.2.2. Grupo de cães residentes em associações/canis

Através da técnica IFI, observou-se que 69,4% (34/49) [IC 95%: 55,5%-80,5%] dos cães possuíam anticorpos contra agentes patogénicos. Os casos positivos estavam distribuídos por 55,1% (27/49) positivos a um único agente e 14,3% (7/49) positivos a vários agentes; quer a dois (4/49), três (2/49) ou aos quatro agentes estudados (1/49). Todos os

casos de co-infecções reportados através da técnica de IFI pertencem a este grupo. Os casos positivos com anticorpos para um só agente estavam distribuídos por: 17 positivos a *R. conorii*, seis positivos a *B. canis* e dois positivos a *A. phagocytophilum*. Nos animais com anticorpos para mais do que um agente, verificou-se as seguintes combinações e respectiva frequência: três positivos a *B. canis* e *R. conorii*; um positivo a *E. canis* e *R. conorii*; um positivo a *A. phagocytophilum*, *B. canis* e *R. conorii*; e por fim um positivo com anticorpos para os quatro agentes (Tabela 10).

Nos esfregaços sanguíneos detectou-se que 42,9% (21/49) [IC 95%: 30,0-56,7] possuíam pelo menos um agente parasitário. Destes, 38,8% (19/49) [IC 95%: 26,4-52,8] tratavam-se de infecções simples, repartidas por 32,7% (16/49) [IC 95%: 21,2-46,6] de infecções por *Mycoplasma* spp. e 6,1% (3/49) [IC 95%: 2,1-16,5] de infecções por *A. phagocytophilum*; e 4,1% (2/49) [IC 95%: 1,1-13,7] de co-infecções por *A. phagocytophilum* e *Mycoplasma* spp. Destes 21 cães em que se observou a presença de um parasita, 16 continham anticorpos para outros parasitas.

6.2.2.2.1. Grupo de cães residentes na SPAD

Analisando de forma isolada os dois locais de recolha do grupo de residentes em associações/canis, na SPAD e através da técnica IFI, detectou-se que 83,3% (5/6) [95%: 43,6%-97,0%] dos animais evidenciavam Ac para um ou mais agentes patogénicos. Destes animais, 50% (3/6) possuíam anticorpos para um único agente, distribuídos por um (1/6) positivo a Ac anti-*B. canis* e dois (2/6) positivos a Ac anti-*R. conorii*, e os outros 33,3% (2/6) possuíam anticorpos para três e para os quatro agentes em estudo, verificando-se um (1/6) animal com Ac anti-*A. phagocytophilum*, anti-*E. canis* e anti-*R. conorii* e um (1/6) animal com anticorpos para os quatro agentes.

Através dos esfregaços verificou-se que 66,6% (4/6) [95%: 30%-90,3%] destes animais apresentavam *Mycoplasma* spp. Todos os cães com a presença de uma parasita também evidenciaram anticorpos para outros agentes parasitários.

6.2.2.2.2. Grupo de cães residentes no CVG

No grupo com o maior número de amostras sanguíneas analisadas, observou-se que 67,4% (29/43) [IC 95%: 52,5%-79,5%] dos animais deste grupo possuíam anticorpos para um ou mais agentes em estudo. A maioria dos animais (55,8%, 24/43) possuía anticorpos para um único agente. No estudo detectou-se uma frequência de 17 animais com Ac anti-*R. conorii*, cinco com Ac anti-*B. canis* e dois com Ac anti-*A. phagocytophilum*. Por sua vez, os restantes 11,6% (5/43) detinham anticorpos para dois ou três dos agentes analisados: três (3/43) animais evidenciaram Ac anti-*B. canis* e Ac anti-*R. conorii*, um (1/43) animal tinha Ac anti-*E. canis* e Ac anti-*R. conorii* e por último um (1/43) animal possuía Ac anti-*A. phagocytophilum*, Ac anti-*B. canis* e Ac anti-*R. conorii*.

Nos esfregaços sanguíneos detectou-se que 39,5% (17/43) [IC 95%: 26,4-54,4] possuíam pelo menos um agente parasitário. Destes, 34,9% (15/43) [IC 95%: 22,4-49,8] tratavam-se de infecções simples, repartidas por 27,9% (12/43) [IC 95%: 16,8-42,7] de infecções por *Mycoplasma* spp. e 7% (3/43) [IC 95%: 2,4-18,6] de infecções por *A. phagocytophilum*; e 4,7% (2/43) [IC 95%: 1,3-15,5] de co-infecções por *A. phagocytophilum* e *Mycoplasma* spp. Destes 17 cães em que se observou um hemoparasita, 12 continham Ac contra outros parasitas.

6.2.2.3. Resultados por hemoparasitas

Os únicos nematodes observados pertenciam à espécie *Dirofilaria immitis*, traduzindo-se numa prevalência de 1,7% (1/59) [IC 95%: 0,3%-9,0%].

A prevalência dos protozoários hemáticos, traduziu-se na seroprevalência detectada pela técnica IFI, ou seja em 24,6% (14/57) [IC 95%: 15,2%-37,1%] de animais positivos à detecção de anticorpos anti-*B. canis*.

A prevalência das bactérias hemáticas neste estudo englobou os cães positivos às espécies *A. phagocytophilum* e *Mycoplasma* spp., detectadas nos esfregaços sanguíneos, verificando-se uma prevalência de 45,8% (27/59) [IC 95%: 33,7%-58,3%]. Observou-se uma prevalência de *A. phagocytophilum* de 8,5% (5/59) [IC 95%: 3,7%-18,4%]. A prevalência de *Mycoplasma* spp. foi de 37,3% (22/59) [IC 95%: 26,1%-50,1%]. Através da técnica IFI, detectou-se uma seroprevalência das bactérias hemáticas de 78% (46/59) [IC 95%: 65,9%-86,7%] (animais com Ac anti-*A. phagocytophilum*, Ac anti-*E. canis*, Ac anti-*R. conorii*). A seroprevalência de *A. phagocytophilum* foi de 8,5% (5/59) [IC 95%: 3,7%-18,4%]. A seroprevalência de *E. canis* foi de 5,1% (3/59) [IC 95%: 1,7%-13,9%]. E a seroprevalência de *R. conorii* detectada foi de 54,2% (32/59) [IC 95%: 41,7%-66,3%].

6.2.2.4. Associações estatísticas – infecções por hemoparasitas e factores de risco

Analizou-se uma possível dependência entre os cães pertencerem a particulares ou residirem em associações/canis com o apresentarem parasitas ou anticorpos contra estes; investigou-se também uma possível relação entre residirem na SPAD ou no CVG. Em ambas as situações não se observaram relações estatisticamente significativas (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição dos resultados dos hemoparasitas observados e anticorpos detectados, por grupo de origem e local de recolha, com respectivas associações estatísticas (n=59)

	Factor	Nº total de amostras	Nº de amostras positivas (parasitas observados ao MOC)	Associação estatística com parasitas observados ao MOC	Nº de amostras seropositivas (detecção Ac por IFI)	Associação estatística com Ac detectados por IFI
Grupo de origem	Cães com detentor	10	5	$\chi^2=0,004$	9	$\chi^2=0,895$
	Cães residentes em associações/ canis	49	21	$g.l.=1$ $p=0,948$	34	$g.l.=1$ $p=0,344$
	SPAD	6	4	$\chi^2=0,669$	5	$\chi^2=1,739$
	CVG	43	17	$g.l.=1$ $p=0,414$	29	$g.l.=1$ $p=0,187$

Procurou-se ainda uma associação estatística entre as diversas características anotadas, aquando da recolha do sangue. No entanto, não se observou uma relação estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os animais apresentarem hemoparasitas ou Ac contra estes e todos os factores analisados, ou seja, a freguesia de residência, o sexo, a raça, o porte, o grupo etário, com ou sem observação de ectoparasitas, ou ainda com a prática de profilaxia contra os endoparasitas (anexo 13).

7. DISCUSSÃO

7.1. Discussão do estudo dos parasitas gastrointestinais

7.1.1. Discussão sobre a caracterização das amostras fecais e população amostrada

A colheita de 136 amostras fecais pretendeu representar o grau de parasitismo gastrointestinal dos cães residentes na cidade do Funchal, bem como analisar a sua relevância para a Saúde Pública. As amostras fecais tiveram origem em dois grupos distintos e deste modo quisemos comparar as diferenças de parasitismo numa população com detentor e numa população residente em associação ou canil. Ambos os grupos ajudam a compreender a população no geral, por exemplo no grupo de cães com detentor, que é a população de cães que partilha uma maior proximidade com o Homem e assim tem um potencial zoonótico importante, um maior ou menor grau de parasitismo ajuda-nos a perceber se estes possuem uma boa saúde, se os detentores estão atentos aos possíveis sinais de parasitismo e se implementam hábitos de profilaxia, tanto por uma preocupação pela saúde do seu animal como pela preocupação das doenças zoonóticas. A população residente em associações e canis também são indicadores do estado da população canina, uma vez que são o resultado da recolha de cães errantes por toda a cidade do Funchal; dentro deste grande grupo obtemos informações sobre os possíveis agentes infecciosos em circulação nas ruas e também avaliamos o grau de parasitismo num grupo com uma densidade populacional

elevada, densidade esta que complica o controlo do parasitismo (Ferreira et al. 2011) e são ainda estes os animais que posteriormente serão adoptados (Little et al. 2009) por famílias madeirenses.

A distribuição das amostras por origem foi heterogénea, mas uma vez que se tratou de uma amostragem por conveniência, nas associações/canis foi possível recolher mais amostras em relação aos detentores dispostos a participar neste estudo.

7.1.2. Discussão dos resultados dos parasitas gastrointestinais

Neste estudo observacional detectou-se que 19,9% das amostras estavam parasitadas com pelo menos um agente parasitário gastrointestinal. Do conhecimento da autora não se dispõe de estudos anteriores na cidade do Funchal ou até mesmo na Ilha da Madeira, de modo a comparar com estes novos dados. No entanto, a comparação da prevalência pontual observada nesta população canina, é possível a nível nacional e aproxima-se das observadas no estudo de Félix (2015), efectuado em cães de canil, em que foi detectada uma prevalência de 25%. Em estudos de outros autores com uma população amostrada semelhante, Ferreira et al. (2011) reportaram uma prevalência superior à deste estudo, com 43% dos cães, com detentor e de canil, parasitados na região de Évora e Leal (2015) detectou uma prevalência de 44% na região de Bragança; no entanto a prevalência pontual detectada com este estudo é superior às encontradas por Melo (2017) na região do Oeste que observou uma prevalência de 15% de cães positivos, com detentor e de associações. Alargando a comparação ao nível mundial, a prevalência parasitária deste estudo é equiparada à encontrada em cães com detentor e residentes em associações/canis na Austrália (23,9%, Palmer et al. 2008) e à reportada em cães de caça na Dinamarca (21,3%, Al-Sabi et al. 2013). No entanto, outros estudos, noutros países relatam prevalências superiores, como em Itália, em cães com detentor (31%, Riggio et al. 2013), em Espanha (71,3%, Martínez-Moreno et al. 2007) ou no Brasil (59%, Ribeiro Campos et al. 2016).

A comparação entre as prevalências obtidas nestes estudos requer sempre uma análise prudente ao extrapolar conclusões de dados de um local para outro, pois apesar de todos os estudos recorrerem aproximadamente aos mesmos meios de diagnóstico, a variabilidade entre os resultados surge não só em diferentes áreas geográficas, como demonstrado no estudo nacional de Félix (2015), como também, consoante a origem das amostras, se proveniente de canis (72,5%, Santos 2014; 63%, Braga 2017), de clínicas/detentores (66,2%, Khante et al. 2009; 11,7%, Silva 2016; 65%, Moro and Abah 2019), de um agrupamento de canis/associações/clínicas/detentores (23,9%, Palmer et al. 2007; 43% Ferreira et al. 2011; 15%, Melo 2017), de quintas (58,8%, Cardoso et al. 2014) ou ainda de amostras recolhidas no ambiente (9,3% Nunes 2014; 38,7%, Silva 2018; 14,6%,

Machado 2019). Ainda dentro da mesma origem verifica-se que as prevalências não são consensuais, com uma influência multifactorial.

Neste estudo observou-se que as infecções parasitárias gastrointestinais estavam repartidas em infecções simples (14%) e infecções mistas por dois agentes (5,9%), em nenhuma amostra parasitada foi detectado mais do que dois agentes. A prevalência de infecções simples está em concordância com outros estudos tanto a nível nacional (Braga 2017; Melo 2017; Nunes 2014; Ferreira et al. 2011), como a nível mundial (Riggio et al. 2013; Al-Sabi et al. 2013; Palmer et al. 2008; Ribeiro Campos et al. 2016; Moro and Abah 2019). Comparando os valores encontrados com os estudos com populações amostradas semelhantes, verifica-se que estes aproximam-se dos encontrados no estudo de Melo (2017) com 13% de infecções simples e de 2% de co-infecções, na região do Oeste, e no estudo de Palmer et al. (2008) com 19,8% de infecções simples e 4,1% de co-infecções, na Austrália, mas, encontram-se abaixo dos reportados por Ferreira et al. (2011), que observou 32,5% de infecções simples e 10,3% de co-infecções, em Évora. Os resultados encontrados partilham ainda o mesmo padrão que o estudo efectuado por Melo (2017), em que as co-infecções caracterizam-se por apenas dois agentes parasitários.

Neste estudo foi observada uma prevalência superior de protozoários (18,4%) do que nematodes (7,4%), sendo que não se detectou a presença de céstodes (0%). Esta razão foi igualmente observada no estudo de Ferreira et al. (2011), com 36,5% de protozoários e 17,5% de nematodes, não tendo sido igualmente encontrado céstodes no seu estudo. No estudo de Palmer et al. (2008) as observações foram semelhantes, mas foi detectado a presença de céstodes, traduzindo-se numa prevalência de 16,1% de protozoários e 9,6% de helmintes (nematodes e céstodes). Os resultados obtidos no estudo de Melo (2017), contudo, diferem, uma vez não foram observados protozoários e foram detectados 16% de nematodes e 1% de céstodes.

A maior prevalência de protozoários em detrimento dos helmintes poderá ser justificada pela tendência global de um crescente acesso e frequência aos cuidados médicos veterinário, em que se recomenda a profilaxia anti-helmíntica (Palmer et al. 2008), porém, uma vez que a maioria dos produtos comerciais disponíveis para profilaxia não actuam sobre os protozoários (Little et al. 2009), assim apenas ocorre uma diminuição nos números de helmintes e altera-se a proporção de infecções por protozoários e infecções por helmintes observada (Robertson et al. 2000; Ferreira et al. 2011).

O uso de anti-helmínticos poderá ainda justificar a ausência de céstodes neste estudo, uma vez que não existe praticamente casos reportados de resistência dos céstodes aos produtos disponíveis no mercado; outra hipótese que apoia este resultado é o facto de a tendência actual ser a alimentação através de rações comerciais processadas, diminuindo o risco de infecção; e por fim a excreção dos proglotes não ser constante, o que faz com que

40-50% das infecções por *Taenia* spp. e cerca de 95% das infecções por *Dipylidium caninum* possam não ser detectadas na análise coprológica (Al-Sabi et al. 2013).

Em relação aos géneros/espécies encontrados, detectou-se a presença de: *Cystoisospora* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Toxocara canis* e *Uncinaria stenocephala*; quer em infecções simples como combinações de um nemátode e um protozoário ou de dois protozoários. Estes resultados estão de acordo com outros estudos nacionais (Ferreira et al. 2011; Félix 2015), assim como os parasitas encontrados, que são os comumente reportados tanto a nível nacional (Melo 2017; Braga 2017) como europeu (ESCCAP 2017; ESCCAP 2018a). As espécies observadas são ainda semelhantes às reportadas num estudo nas Ilhas Canárias (Espanha), que é a região geograficamente mais próxima da ilha da Madeira (Valladares-Salmeron et al. 2016).

As combinações verificadas nas co-infecções estavam equitativamente distribuídas em quatro co-infecções por um nemátode e um protozoário e quatro co-infecções por duas espécies de protozoários. Estes resultados não foram concordantes com outros estudos nacionais, em que as co-infecções por nemátodes e protozoários foram superiores às co-infecções por vários protozoários (Ferreira et al. 2011; Santos 2014) e que direccionaram para a hipótese de que as co-infecções por protozoários não seriam frequentes (Leal 2015).

A prevalência do protozoário *Giardia* spp. não é consensual entre estudos, sendo influenciada pelo meio de diagnóstico utilizado e o número de amostras examinadas, devido à excreção intermitente dos quistos (Thompson et al. 2008). Os meios de diagnóstico actuais apresentam uma maior sensibilidade, podendo levar a um aumento aparente da prevalência (Robertson et al. 2000). No entanto a superioridade da prevalência de *Giardia* spp. observada neste estudo é compatível com os estudos nacionais (Ferreira et al. 2011; Santos 2014; Nunes 2014; Braga 2017; Machado 2019) e mundiais (Palmer et al. 2008), efectuados em populações caninas de várias origens (verificam-se algumas diferenças nas prevalências, mas em todos os estudos a *Giardia* spp. foi o parasita predominante). Além da hipótese acima exposta, sobre o maior uso de anti-helmínticos poder justificar os estudos mostrarem uma maior presença de protozoários, em detrimento dos helmintes, a maior prevalência de *Giardia* spp. poderá estar relacionada com o ciclo directo do parasita e por ser usualmente uma infecção subclínica, o que leva à excreção de quistos para o ambiente, com a possibilidade dos quistos contaminarem água e alimentos, propagando a infecção sem os detentores terem conhecimento; e ainda dado ao potencial zooantroponótico de algumas espécies de *Giardia* spp. (Bowman 2014).

De forma semelhante, neste estudo todas as espécies observadas têm um ciclo de vida directo, o que em combinação com outros factores de risco que possibilitem um contacto com fezes contaminadas, aumenta o risco de exposição e aquisição de infecções parasitárias. Segundo Palmer et al. (2008) os factores de risco são a co-habitação intra-espécie, para os

parasitas com afinidade para os cães, e interespecie, para os parasitas com uma menor especificidade de hospedeiros; e ainda o acesso a espaços frequentados por outros animais, como os jardins e parques. Uma vez que neste estudo analisou-se uma população canina que na sua maioria partilha o espaço com outros cães e que conta com um passado desconhecido, em que como animais errantes terão frequentado diversos espaços públicos partilhados, estes factores de risco são pertinentes e poderão justificar os resultados encontrados. Ribeiro Campos et al. (2016) demonstraram um acréscimo de duas a três vezes no risco de infecção por parasitas, em cães com acesso à rua ou com locais públicos possivelmente contaminados, mostrando a grande importância deste factor.

Do ponto de vista da saúde pública das cinco espécies detectadas neste estudo, duas apresentam potencial zoonótico; a relatar os nematodes *T. canis*, responsável pela Larva Migrante Ocular e Larva Migrante Visceral no Homem, e *U. stenocephala*, responsável pela Larva Migrante Cutânea no Homem. Os protozoários observados (*Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp.) poderão constituir um risco, no entanto, neste estudo não se analisou os genótipos. Deste modo, apesar da prevalência parasitária global encontrada ser concordante com o panorama nacional, é de salientar o possível risco para a saúde pública. Com estes resultados torna-se imperioso uma abordagem *One Health* e a educação dos detentores para o que é uma zoonose e como devem prevenir-se, para o benefício de ambas as partes (WHO 2017).

Uma vez que dispúnhamos de amostras fecais, optámos por também realizar a técnica de Baermann, para pesquisa de larvas L1 de nematodes pulmonares, apesar de idealmente e para uma maior sensibilidade da técnica, esta ser realizada com amostras fecais de três dias e não de apenas uma única recolha (Al-Sabi et al. 2013; Alho et al. 2013). Esta técnica é o teste de eleição para o diagnóstico de *A. vasorum*, pois os seus ovos são frágeis e têm um tempo curto entre a ovopostura e eclosão larvar (Alho et al. 2013); e são estas mesmas características que poderão justificar os resultados negativos, tendo em conta o período que decorreu entre a recolha das amostras, transporte e análise no laboratório. Assim, os resultados poderão subestimar a presença de *A. vasorum* na cidade do Funchal. Num estudo de Alho et al. (2016), elaborado entre 2011 e 2014 e com recurso à técnica ELISA, foi detectado uma prevalência de *A. vasorum* entre 0% e 3,8% nos vários distritos de Portugal Continental, mas não existe um estudo na população madeirense.

Uma vez que através dos inquéritos realizados aos detentores e da localização da SPAD e CVG, conseguiu-se analisar animais residentes em seis das dez freguesias que compõem o Funchal, detectou-se uma associação estatisticamente significativa entre a freguesia de residência e o parasitismo detectado ($\chi^2=27,009$; g.l.=5; $p=0,00006$), concluindo que nesta população, a freguesia de residência é um factor de risco.

7.1.3. Discussão dos resultados por grupo de origem

Ao passar para uma análise dos resultados individuais de cada grupo, de modo a compreender as particularidades de cada comunidade, verifica-se, proporcionalmente ao seu grupo, uma prevalência de 27% de cães com detentor infectados (10/37). Esta é superior à prevalência encontrada no conjunto de cães provenientes de associações/canis, que foi de 17,2% (17/99). Contudo não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre a origem dos cães (com detentor *versus* residentes em associações/canis) e estes estarem parasitados ($p>0,05$). A maior prevalência parasitária no grupo de cães com detentor é o oposto do que seria expectável, de acordo com os vários estudos equiparados (Ferreira et al. 2011; Palmer et al. 2008). A prevalência neste estudo é ainda superior à encontrada noutros estudos realizados com cães com detentor (16,0% Palmer et al. 2008; 22,0%, Ferreira et al. 2011; 11,7% Silva 2016). Comumente os cães com detentor beneficiam de mais cuidados médico-veterinários, de hábitos de prevenção e controlo dos parasitas, e de um acompanhamento mais próximo, levando a que a detecção de sinais clínicos ou parasitas seja mais precoce e eficaz. Na população analisada e de acordo com os inquéritos associados, verificamos que apenas 32,4% tinha a desparasitação externa em dia e 45,9% a desparasitação interna em dia; neste estudo não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre estes factores e os animais estarem parasitados, mas estas percentagens encontram-se abaixo de outros estudos equiparados. Pereira et al. (2016) numa pesquisa realizada junto de detentores sobre o conhecimento de zoonoses e hábitos de profilaxia em Portugal Continental observaram que 95,5% dos questionados realizava profilaxia endoparasiticida e 91,7% realizava profilaxia ectoparasiticida, no entanto apenas 67,7% e 26%, respectivamente o fazia de forma regular. Vários estudos mostram-nos a irregularidade dos hábitos de profilaxia (Matos 2013; Ribeiro Campos et al. 2016; Pereira et al. 2016) e que a aplicação de anti-parasitários está por vezes relacionada com a suspeita ou observação de parasitas e não como um hábito de prevenção (Matos 2013; Valladares 2016).

No grupo de cães com detentores observou-se a presença das 5 espécies detectadas neste estudo: dois nemátodes (*T. canis* e *U. stenocephala*) e 3 protozoários (*Cystoisospora* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.). Uma vez que parte das infecções por estes parasitas são subclínicas, poder-se-á justificar o menor grau de desparasitação aplicado nesta população com os detentores não se aperceberem e não actuarem para a prevenção.

Pereira et al. (2016) averiguaram ainda que apenas 56,5% dos inquiridos no seu estudo tinha ouvido falar em zoonoses e destes só 35,2% sabia o seu significado; dado que neste estudo, no grupo de cães com detentor, todos os animais positivos apresentavam parasitas com possível potencial zoonótico (*T. canis*, *U. stenocephala*, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.), a falta de regularidade na profilaxia é extremamente pertinente. Duas das cinco espécies detectadas neste grupo são protozoários, que não sendo visualmente

observáveis, dificultam ainda mais a percepção dos donos para a urgência de realizar profilaxia, no entanto é precisamente para estes dois protozoários que terapêutica é mais complicada, quer devido à disponibilidade de medicamentos eficientes, tanto na medicina veterinária como humana, quer por algumas resistências farmacológicas detectadas (Moron-Soto 2017).

Outro factor analisado neste grupo foi a co-habitação intra e interespécies, mas a relação entre estes factores não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). No entanto dado os resultados verificados, de vários animais em co-habitação sem hábitos de profilaxia e com a presença de parasitas, existe a necessidade de alertar estes detentores para os hábitos de profilaxia, para as doenças zoonóticas e para os factores de risco.

O acesso a espaços públicos e o parasitismo detectado por sua vez não foi estatisticamente significativo; o baixo número de animais com acesso a estes espaços justifica-se pela maioria da população estudada habitar em moradias com quintal e jardim.

A questão sobre o tipo de alimentação mostrou-nos uma maior prevalência de animais alimentados exclusivamente com comida caseira cozinhada, mas a associação entre o tipo de alimentação e o parasitismo não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). Apesar de se observar uma crescente tendência para uma alimentação com produtos crus e o risco parasitológico que estas acarretam (Ribeiro Campos et al. 2016), nenhum detentor na população analisada aderiu a este movimento.

Em oposição ao verificado neste estudo, na população residente em associações/canis é esperado uma maior prevalência de infecções, uma vez que estes têm uma maior susceptibilidade para infecção, devido à imunossupressão pelo stress, ao contacto directo com muitos outros animais e os seus dejectos, e à contaminação ambiental verificada num espaço com elevada densidade animal (Palmer et al. 2008; Raza et al. 2018). A inversão da razão das prevalências esperadas entre o grupo de cães com detentor (27%; 10/37) e o grupo cães residentes em associações/canis (17,2%; 17/99), poderá ser explicada pelas medidas profilácticas adoptadas pela equipa gestora médico-veterinária responsável tanto pela associação como pelo canil. São implementadas medidas preventivas a partir do momento em que recebem um animal, como a realização de um exame clínico, a desparasitação à entrada e ainda, no caso da SPAD, recorrem à área de quarentena, antes de juntar aos restantes habitantes. Posteriormente, para os residentes, as medidas profilácticas continuam a ser um factor chave da equipa gestora, com *boxes* com pavimentos adequados que permitem uma boa limpeza e desinfecção do espaço, com limpezas regulares e uma desparasitação regular.

A prevalência encontrada no grupo de residentes em associações/canis, de 17,2%, está abaixo da prevalência nacional verificada no estudo de Félix (2015), de 25%; dentro do mesmo estudo de Félix (2015) e nas 8 regiões em Portugal Continental analisadas, a

prevalência detectada na cidade do Funchal é apenas superior às registadas nos canis de Lisboa (10,3%) e Faro (8,7%). A prevalência pontual dos residentes em associações/canis da cidade do Funchal é ainda inferior às observadas nos canis da região de Évora (63%; Braga, 2017) e no canil de Vila Franca de Xira (região de Lisboa) (72,5%; Santos, 2014), assim como às prevalências observadas em diversos canis a nível mundial, como podemos verificar na revisão de Raza et al. (2018). A comparação com as prevalências observadas com os outros canis, demonstra o sucesso do trabalho realizado nesta associação e canil madeirense.

7.1.3.1. Discussão dos resultados na SPAD e no CVG

Isolando os resultados por local de recolha dentro do grupo de cães residentes em associações/canis, verificou-se uma maior prevalência na SPAD (35%) do que no CVG (5,1%), sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em ambos os casos falamos de animais cujo historial sanitário, pré-entrada na associação/canil, era desconhecido e que habitavam uma área com uma elevada densidade animal. Mas ambos partilhavam espaços físicos adequados a uma boa higiene e graças à gestão feita pela mesma equipa, ambos partilhavam as mesmas regras de profilaxia. Assim, a diferença no parasitismo encontrado poder-se-á justificar por a SPAD usufruir de uma zona de quarentena e de tratamento, que abrigava os animais recolhidos numa primeira instância, e ser o local onde permaneciam as mães e os cachorros, uma vez que no momento de recolha não existiam condições para manter estes animais no CVG. A maioria das amostras parasitadas (11/14) na SPAD pertenciam a animais alojados na zona de tratamento, quarentena e maternidade, com uma minoria (3/14) a pertencer aos cães alojados na zona da ribeira, ou seja, na zona direccionada para os habitantes da associação. Ainda relativamente aos parasitas encontrados, foram detectadas as quatro espécies (*T. canis*, *U. stenocephala*, *Cystoisospora* spp. e *Giardia* spp) nos animais situados nas zonas de quarentena, internamento e maternidade, quer em situações de infecções simples como infecções mistas; na zona da ribeira, foi detectado apenas a espécie *T. canis*. Assim a maior prevalência parasitária e o tipo de parasitas encontrados justificam-se dado as características dos animais em cada zona.

No CVG a prevalência parasitária (5,1%) foi bastante pequena, principalmente comparando com outros estudos realizados em canis (72,5%, Santos (2014); 25%, Félix (2015); 63%, Braga (2017)), e as infecções caracterizaram-se por apenas uma espécie. Neste grupo foi detectado a presença de *T. canis* e *Giardia* spp. Uma vez que estes animais, apesar do stress e densidade animal, beneficiam de uma boa higiene, de cuidados médico-veterinários e acima de tudo vigilância, e com o acordo realizado com a SPAD, é expectável que os animais a habitar no CVG já tenham passado por uma triagem e sejam os animais saudáveis ou aparentemente saudáveis.

7.1.4. Discussão das limitações do estudo de parasitas gastrointestinais

Este estudo apresentou algumas limitações, como o período de recolha das amostras e o número das mesmas. As amostras colhidas foram de apenas um único dia e dado que muitos dos parasitas gastrointestinais caracterizam-se por uma excreção intermitente, uma única amostra poderá subestimar o número real do parasitismo desta população (Robertson et al. 2000). Um outro benefício seria a inclusão de mais amostras provenientes de cães com detentores assim como a obtenção de informação uniforme em todos os grupos. No grupo de animais residentes em associações/canis, com as limitações próprias da colheita de um grande número de amostras, não foi exequível observar individualmente cada cão para melhor caracterizar este grupo em relação à distribuição etária, sexo e outros factores. Esta análise seria uma mais valia para relacionar com o grau de parasitismo e perceber as associações estatísticas e implicações sanitárias.

Uma das limitações e com possível interferência na prevalência observada poderá ter sido o período de recolha das amostras neste estudo, durante o Inverno e início da Primavera. Braga (2017) no estudo sobre as prevalências parasitárias e a sazonalidade, efectuado em cães de canil, na região de Beja, observou uma prevalência superior no Verão (31%), seguida do Inverno (30%), Outono (21%) e por último na Primavera (18%). No entanto é necessário ter em atenção à localização geográfica privilegiada da cidade do Funchal e o seu clima ameno característico, com temperatura média anual de 19°C, ao contrário da região de Beja, que apresenta grandes variações térmicas. Assim a predição de possíveis variações na prevalência decorrente da estação de recolha (acima ou abaixo do esperado) necessita de ser cautelosa, tendo em conta apenas este estudo e comparação com o de Braga (2017).

A localização isolada da Madeira, devido às características geográficas de uma ilha, poderia limitar a circulação e presença de alguns parasitas gastrointestinais, mas, novamente, o clima húmido e com pouca variabilidade térmica ao longo do ano são características propícias ao proliferamento parasitário; acresce o facto da Madeira ser um destino turístico que agregado à crescente circulação de animais de companhia, a acompanhar os seus donos em férias, potencializa um risco sanitário.

Em particular neste estudo e conforme os resultados observados na análise do sedimento, em que se detectou 3 novos casos positivos a *Toxocara canis*, cujos ovos não haviam sido detectados na flutuação, poderá ter ocorrido uma falha na densidade da solução de sacarose utilizada, não estando saturada. A solução foi preparada em diversos lotes no laboratório, consoante a necessidade ao longo dos vários dias em que decorreram as análises coprológicas. Na densidade almejada para esta solução, os ovos de *T. canis*, dado o seu peso, devem flutuar (Foreyt 2001); o que nos indica que a solução utilizada naquelas três amostras estava aquém do pretendido.

7.2. Discussão do estudo dos parasitas hemáticos

7.2.1. Discussão sobre a caracterização das amostras sanguíneas e população amostrada

Através da colheita de 59 amostras sanguíneas pretendeu-se analisar o parasitismo presente nos cães residentes na cidade do Funchal, não só através da observação dos parasitas, mas também através da pesquisa de anticorpos anti-parasitas, ou seja, pesquisou-se um reflexo de uma infecção por agentes parasitários. Para tal e à semelhança das amostras fecais anteriormente discutidas, realizou-se uma amostragem por conveniência nos dois grupos distintos, numa população com detentor e numa população residente em associação ou canil. A distribuição das amostras foi heterogénea, com maior representatividade do grupo de cães residentes em associação/canil (83% das amostras), pois a acessibilidade foi maior nesta população do que junto dos detentores (17% das amostras).

Ao contrário do observado no estudo dos parasitas gastrointestinais, não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre a freguesia de residência e a infecção por hemoparasitas. Também não se verificou uma relação entre as características como a raça, o sexo, o porte e o grupo etário e a presença de infecções parasitárias. Este estudo foi concordante com o indicado na revisão de Sainz et al. (2015), que indica não existir uma predisposição de raças (das analisadas neste estudo), nem de sexo, para a presença de infecções por *E. canis* ou *A. phagocytophilum* e *A. platys*. Sainz et al. (2015) também mostram não existir uma predisposição da idade, apenas observaram que os cães mais velhos eram mais frequentemente diagnosticados como seropositivos em relação a animais jovens, por uma maior probabilidade de exposição ao longo do tempo. Vrhovec et al. (2017) e Springer et al. (2019) nos seus estudos sobre as CVBD obtiveram conclusões semelhantes.

No exame físico pré-colheita de sangue verificou-se que a maioria estava isenta de ectoparasitas (95%) e que apenas 3 cães apresentavam uma baixa infestação por pulgas (5%). Os animais com presença de pulgas pertenciam a detentores e após detecção, os detentores foram aconselhados para a terapêutica e profilaxia adequada. Apesar da baixa detecção de ectoparasitas, não se conseguiu obter dados caracterizantes acerca dos hábitos de profilaxia contra os ectoparasitas na população amostrada; em 83% dos cães sabe-se que a desparasitação fazia parte do protocolo, pois pertenciam ao grupo de residentes no canil e associação, onde era realizada a desparasitação à entrada dos animais, mas não se conseguiu esclarecer o plano posterior, nem os produtos utilizados. Pelo contrário, 81,4% da população estudada realizava profilaxia contra os endoparasitas. Nos animais residentes na associação/canil era feita a prevenção com ivermectina e no grupo de detentores verificou-se uma maior percentagem de donos com hábitos de profilaxia endoparasiticida (30%), em comparação com o observado para os ectoparasiticidas (10%). Usualmente a desparasitação

externa apresenta uma melhor adesão por parte dos detentores do que a interna, uma vez que é mais fácil a detecção e assim a percepção do risco dos ectoparasitas em comparação com o que não é visível (Valladares 2016). Contudo, observou-se o contrário neste estudo, apesar de ser uma diferença pequena; aquando da recolha das amostras fecais nesta população observou-se um comportamento semelhante. Pereira et al. (2016) no seu estudo nacional também detectaram uma maior prevalência de detentores a utilizar endoparasitocidas. Poder-se-á supor que esta diferença se deva à frequência de aplicação dos produtos ecto e endoparasitocidas, já que a maioria dos produtos comerciais ectoparasitocidas exige uma maior frequência de aplicação.

7.2.2. Discussão dos resultados dos hemoparasitas

Numa análise global dos resultados da pesquisa de hemoparasitas verificamos uma prevalência elevada, de 44,1% de animais infectados e de 73% de animais seropositivos, ou seja, que contactaram com agentes parasitários. São poucos os estudos em território nacional que combinam a pesquisa de hemoparasitas por técnicas morfológicas e técnicas serológicas, no entanto a prevalência neste estudo está acima da encontrada por Caeiros (2012) num estudo com cães residentes em canil e com detentor no distrito de Lisboa, em que detectou uma prevalência de 2,5% através das técnicas morfológicas, prevalência esta referente à espécie *Hepatozoon* spp. não detectada neste estudo, e 71,3% através das técnicas serológicas por IFI (*A. phagocytophilum*, *B. canis*, *E. canis* e *R. conorii*).

Analisando os resultados de forma individual por técnica, a prevalência de hemoparasitas detectados por esfregaço sanguíneo (44,1%) é marcadamente superior a vários estudos a nível nacional, como o de Caeiros (2012) em cães de canil e com detentor no distrito de Lisboa (2,5%) e o de Silva (2014) em cães de canil em Vila Franca de Xira (Lisboa) que não observou nenhum hemoparasita por esfregaço, mas encontra-se abaixo dos resultados obtidos por Braga (2017) em cães de canil na região de Évora (74,3%). As espécies observadas estão de acordo com o anteriormente reportado em populações caninas portuguesas (Cardoso et al. 2012; Vidal et al. 2014; Alho et al. 2016; Braga 2017), sendo que a prevalência de *Mycoplasma* spp. (33,9%) encontra-se acima dos 2,5% detectados por Vidal et al. (2014) num estudo nacional em cães militares, mas abaixo dos 68,4% detectado por Braga (2017). Por sua vez, a prevalência de *Dirofilaria immitis* foi uma surpresa neste estudo, pois os 1,7% detectados estão aquém das prevalências reportadas em estudos anteriores e até mesmo no estudo de Cardoso (2019) posterior ao da aluna. No entanto aqui interfere a técnica utilizada e a sensibilidade da mesma. O teste da gota a fresco é rápido e barato, mas apresenta uma baixa sensibilidade, originando frequentes falsos negativos; por sua vez a técnica de Knott apresenta uma maior sensibilidade, é barata e permite a diferenciação de espécies, mas a sensibilidade e especificidade desta técnica é dependente do operador; os

testes serológicos são os que apresentam uma maior sensibilidade e especificidade, com a desvantagem de um maior custo (ESDA 2017). A ilha da Madeira é considerada uma zona hiperendêmica com diversos estudos na região a incidir na prevalência de *D. immitis*, recorrendo a várias técnicas, deste o teste de gota a fresco, ao teste de Knott modificado e aos testes serológicos. De acordo com Clemente (1996) e Araújo (1996) citados por Alho (2017, p.4), observou-se uma prevalência de 22 a 30% de cães microfilarémicos; mais tarde Gomes (2009) detectou uma prevalência superior, de 62,5%, através do uso das três técnicas anteriormente mencionadas para diagnóstico, a maior sensibilidade das técnicas utilizadas poderá justificar a diferença observada entre estudos. Com recurso à combinação de técnicas, Pereira (2010) detectou uma prevalência mais baixa, de 11,67%, todavia as amostras analisadas provinham de cães assistidos em clínicas e assim um maior cuidado médico-veterinário poderá justificar este valor mais baixo. Por sua vez Cardoso et al. (2012) com recurso ao diagnóstico por ELISA detectou 40,0% dos cães positivos. Recentemente, no estudo de Cardoso (2019), através da gota a fresco e teste serológico, foi observado 34,6% de cães positivos, numa população mista de cães com detentor e cães errantes. Apesar das variações de prevalência entre estudos, quer pelas técnicas utilizadas como pelas diferentes populações analisadas, serem superiores ao detectado neste estudo, esta diferença poderá resultar da menor sensibilidade da técnica utilizada, assim como 81,4% da população estudada efectuar prevenção contra a *D. immitis*; uma vez que eram cães residentes em associação/canil que tinha como protocolo esta prevenção.

Neste estudo, três animais foram excepcionalmente analisados por testes rápidos de imunocromatografia, pois foram assistidos em clínica e por não efectuarem a prevenção, foram testados. Destes apenas um apresentou microfírias, detectadas no esfregaço sanguíneo e técnica de Knott, no entanto os outros dois foram negativos a estas técnicas. O teste utilizado nesses dois cães foi o teste rápido Uranotest® *Dirofilaria* (Urano Vet SL, Barcelona, Espanha) e a justificação de os animais serem antígeno positivos mas amicrofilarémicos, poderá dever-se à infecção presente ser por parasitas de um único sexo (sem ocorrer reprodução), ou por os parasitas presentes serem adultos imaturos (5-6 meses pós-infecção) ou ainda por ter ocorrido a eliminação das microfírias pelo sistema imunitário. Uma outra justificação para estes resultados, mas que não se adequa a estes dois cães, é os animais efectuarem medicação preventiva (microfilaricida) ou após terem efectuado tratamento filaricida, pois o antígeno pode persistir até 4 meses. Para estes dois animais seria preciso mais investigação para confirmar o diagnóstico: através de raio-x e ecocardiografia para estadiamento e no caso de permanecer a dúvida, em zonas de baixa prevalência, repetir o teste 3 meses depois (ESDA 2017). Porém não foi possível acompanhar o decorrer do processo e desconhece-se o diagnóstico final e desfecho destes dois animais.

Neste estudo observou-se que vários dos animais infectados por hemoparasitas no momento de recolha também evidenciavam Ac para outros agentes patogénicos, assim como vários animais evidenciaram Ac para mais do que um agente. A combinação de agentes parasitários prevalente neste estudo foi a observação ao MOC de *Mycoplasma* spp. com a evidência de Ac anti-*Rickettsia conorii* mas detectou-se um total de 12 combinações diferentes. Uma vez que se tratam de combinações de parasitas observados com a detecção de anticorpos, ou seja, uma evidência indirecta da infecção, estas combinações de co-infecções podem ter decorrido na mesma janela temporal ou não. Os resultados positivos por IFI devem sempre ser interpretados com precaução, pois a interpretação de um título positivo em áreas endémicas pode ser difícil (Solano-Gallego and Baneth 2011; CVBD 2019), já que os animais se mantêm seropositivos durante bastante tempo após a eliminação do agente.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo por IFI com outros estudos serológicos requer sempre prudência, pois verifica-se uma grande variabilidade nas técnicas serológicas utilizadas assim como nos limiares de positividade considerados.

Os resultados obtidos no presente estudo são marcadamente superiores aos detectados no estudo nacional de Cardoso et al. (2012) que verificaram uma seroprevalência de 14,0% em animais assintomáticos e 46,3% em cães com suspeita de hemoparasitas, mas com recurso a uma técnica serológica diferente (ELISA). No mesmo estudo, Cardoso et al. (2012) também analisaram 10 amostras de cães provenientes da ilha da Madeira e pesquisaram a presença de *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. e *Leishmania infantum*, no entanto apenas detectaram a presença de *D. immitis* (40,0%). Assim, este estudo actual vai de encontro a estes dados e mostra a presença distinta de animais com resposta a infecção por *A. phagocytophilum* (8,5%), *B. canis* (24,6%), *E. canis* (5,1%) e de *R. conorii* (54,2%) na cidade do Funchal. Se se comparar os valores encontrados, utilizando para comparação a prevalência nacional em cães assintomáticos, tal como os cães deste estudo, a seroprevalência detectada por Cardoso et al. (2012) de *A. phagocytophilum* (4,5%) e *E. canis* (4,1%) continua a ser inferior, apenas aproximando-se das observadas localmente na região de Lisboa (6,3% e 6,3%).

A seroprevalência global neste estudo aproxima-se um pouco mais de outros estudos feitos em território nacional, como o trabalho de Silva (2011) que detectou uma seroprevalência de 58,8% em cães de canil utilizando a mesma técnica de diagnóstico e pesquisando os mesmos agentes parasitários, e do estudo de Ferreira (2008) que detectou uma seroprevalência de 61%. Contudo analisando as seroprevalências de forma isolada por agente, obtemos algumas discordâncias, pois Silva (2011) detectou uma seroprevalência de *E. canis* três vezes superior (16,3%) e uma seroprevalência de *R. conorii* duas vezes inferior (23,8%). As seroprevalências detectadas por Silva (2011) de *A. phagocytophilum* (12,5%) e *B. canis* (20%) aproximam-se das encontradas neste estudo; apesar das diferenças, é de notar

que em ambos os estudos a infecção por *R. conorii* foi prevalente. Este dado também foi concordante nos estudos de Alexandre (2005) (38,5%) e Ferreira (2008) (88,5%). Maia et al. (2015) por sua vez detectaram em cães errantes do Algarve, uma prevalência aproximada, de 68% de cães positivos, no entanto com uma técnica diferente, com maior sensibilidade e especificidade (PCR).

Por sua vez, alargando a comparação a nível mundial, Vhrovec et al. (2017) num estudo retrospectivo envolvendo amostras recebidas por um laboratório, na Alemanha, detectaram 41,9% de amostras com Ac para *A. phagocytophilum*, 11,5% com Ac para *B. canis* e 15,1% de amostras com Ac para *E. canis*, indicando valores superiores aos detectados neste estudo, excepto para *B. canis*. Igualmente, Springer et al. (2007) detectaram seroprevalências superiores a este estudo em cães na Costa Rica, todavia recorrendo a um método diferente (ELISA) e observaram uma prevalência de 13,3% de *Anaplasma* spp., 23,1% de *Babesia* spp. e 39,5% de *E. canis*.

7.2.3. Discussão dos resultados por grupo de origem

Quando analisado individualmente cada grupo, de modo compreender as particularidades de cada comunidade, verificou-se, proporcionalmente ao seu grupo, uma prevalência de 50% de cães com detentor com presença de parasitas e 90% com Ac anti-parasitas. Esta é aproximada da prevalência e seroprevalência encontrada no conjunto de cães provenientes de associações/canis, de 42,9% e 69,4% respectivamente. Não se verificou uma associação estatística entre a origem dos cães (com detentor *versus* residentes em associações/canis) e estes estarem parasitados. Para qualquer um dos grupos esta é uma prevalência e seroprevalência de hemoparasitas elevada. Os resultados encontrados no grupo de cães com detentor acarretam uma preocupação, pois todos os cães apresentaram agentes parasitários ou Ac contra agentes patogénicos transmitidos por vectores, demonstrando a importância de manter hábitos de profilaxia contra os ectoparasitas. A prevalência de CVBD aliado às conclusões obtidas na caracterização do grupo, em que se detectou 30% dos animais com ectoparasitas, que 50% dos detentores não realizava profilaxia ectoparasiticida e apenas 10% a realizava de forma eficaz é preocupante e demonstra a necessidade de prevenir e de educar para os riscos que advêm da irregularidade ou falta de profilaxia. Cada cão ao longo da sua vida pode ser picado por diferentes vectores infectados com diferentes agentes ou um só vector pode estar infectado por mais do que um agente, e uma vez que a co-infecção por CVBD aumenta a patogenicidade destes, é fundamental disseminar estes conhecimentos pelos detentores para originar uma maior adesão à prevenção. Relativamente aos hábitos de profilaxia direccionada para os endoparasitas observou-se um ligeiro aumento de detentores a realizar esta prevenção (30%), em relação aos ectoparasiticidas (10%). Apesar de ser um número baixo, uma possível justificação para

estes 30% será por estes animais em específico serem assistidos na clínica Vetmedis, na qual a prevenção para a dirofilariose é um assunto frequentemente debatido em consulta. O único cão positivo a *D. immitis* neste estudo não realizava profilaxia e num estudo posterior, de Cardoso (2009), em que os detentores da ilha da Madeira foram questionados sobre o conhecimento da dirofilariose e os hábitos de desparasitação, verificou-se que este não é um caso isolado, que 56% não realiza prevenção para este parasita, apesar de 75% dos inquiridos já ter ouvido falar do parasita e 68% saber que a prevenção é possível.

Os animais com Ac contra mais do que um agente patogénico, pertenciam ao grupo dos animais residentes em associações/canis. Estes resultados são expectáveis tendo em conta o passado desta população, na sua maioria animais errantes e sem cuidados médico veterinários por um tempo indeterminado. Sendo estes os animais que melhor demonstram os parasitas em circulação na cidade, estes dados trazem-nos uma preocupação acrescida com os vectores infectados distribuídos por toda a cidade; vectores estes capazes de infectar novos animais de companhia errantes ou com detentor, e ainda no caso de *A. phagocytophilum* e *R. conorii* o Homem, dado o seu potencial zoonótico.

7.2.3.1. Discussão dos resultados na SPAD e no CVG

Isolando os resultados por local de recolha dentro do grupo de cães residentes em associações/canis, verificou-se uma prevalência e seroprevalência superior na SPAD, do que no CVG, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa. Em ambos os casos se tratavam de animais cujo historial sanitário, pré-entrada na associação/canil, era desconhecido. Contudo todos os animais testados neste estudo provenientes da SPAD estavam alojados na zona de quarentena e tratamento, assim, a proveniência destes cães (animais errantes) e a área de recolha das amostras justifica este resultado. Ainda neste grupo, detectou-se que 66% possuía anticorpos para um agente parasitário com potencial zoonótico (*A. phagocytophilum* e *R. conorii*) demonstrando a importância desta população para a Saúde Pública.

No grupo de cães residentes no CVG detectou-se o maior número de combinações de agentes parasitários observado neste estudo, demonstrando a possível diversidade das infecções presentes nos vectores em circulação na cidade. A maioria dos animais deste grupo eram adultos e embora desconheça-se o tempo que poderão ter passado na rua, dado à idade possuíram uma maior probabilidade de serem picados por uma carraça e contraírem uma CVBD (Vrhovec et al. 2017; Springer et al. 2019). Os animais em que se observou a presença ao MOC de *A. phagocytophilum* pertenciam a este grupo, o que associado à seroprevalência de 7% com Ac anti-*A. phagocytophilum* e 51,2% com Ac anti-*R. conorii* demonstram a importância desta população, no que concerne ao potencial zoonótico e à Saúde Pública.

Nos animais em que se observou mórulas de *A. phagocytophilum* no esfregaço, não se detectou anticorpos pela técnica de IFI, indicando que tratar-se-iam de infecções recentes, e ainda não tinha ocorrido a seroconversão. Sainz et al. (2015) demonstraram, através da infecção experimental com *A. phagocytophilum*, que os Ac são detectáveis oito dias pós exposição ao agente e dois a cinco dias após o aparecimento da mórula. Por sua vez nos animais com Ac para este agente parasitário não se observou mórulas no esfregaço sanguíneo, nestes animais poderia estar em curso uma infecção e dada a baixa sensibilidade do esfregaço não se observaram as mórulas ou os Ac detectados poderiam ser o reflexo de uma infecção no passado, pois uma única titulação apenas nos indica uma resposta e os Ac permanecem em circulação por vários meses ou anos (Sainz et al. 2015).

7.2.4. Discussão das limitações do estudo de parasitas hemáticos

O número de amostras recolhidas apesar de contribuir para o estudo dos hemoparasitas nesta população, é uma amostra limitada, tendo em conta a estimativa de 11 mil a 18 mil cães a habitar no Funchal. Principalmente no grupo de cães com detentor seria extremamente benéfico alargar este estudo, tanto para um maior rigor estatístico como para uma melhor caracterização desta população. Com os resultados obtidos seria igualmente interessante expandir o estudo para os restantes cães habitantes da ilha da Madeira, assim como a outros parasitas, de modo a caracterizar melhor esta população pouco estudada

O facto de muitos hemoparasitas apresentarem uma parasitemia transitória e o diagnóstico ter sido efectuado por técnicas morfológicas, poderá levar a uma subestimação da prevalência de hemoparasitas; uma vez que estas técnicas, apesar de rápidas e com um baixo custo, apresentam uma menor sensibilidade (ESDA 2017).

Por sua vez, a técnica serológica escolhida, a IFI, apesar de apresentar uma melhor sensibilidade, a interpretação dos resultados exige cuidado. É importante realçar que a positividade é determinada pelo operador, ao avaliar o grau de fluorescência (em comparação com os pocilhos positivo e negativo de controlo), de modo que a subjectividade nesta técnica poderá influenciar a sensibilidade e os resultados. Estão ainda reportados algumas reacções cruzadas com estes testes, influenciando a especificidade. Idealmente para uma maior precisão poder-se-ia complementar o estudo com técnicas moleculares.

Por fim, presentemente a cidade do Funchal beneficia de uma actualização deste estudo e dados, uma vez que logo após a recolha das amostras entrou em vigor a proibição do abate nos canis, sobrecarregando os já sobrelotados espaços de recolha. Uma nova análise a esta população seria relevante para perceber se há alterações do grau de parasitismo e zoonoses detectadas.

8. CONCLUSÃO

Observou-se que 19,9% dos cães residentes na cidade do Funchal, Ilha da Madeira, estavam parasitados com uma ou mais espécies de parasitas gastrointestinais. Detectou-se a presença dos nematodes *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala* e dos protozoários *Cystoisospora* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Considerando que algumas das espécies detectadas neste estudo apresentam potencial zoonótico, a percentagem de animais positivos é relevante para a Saúde Pública.

Relativamente aos parasitas hemáticos detectou-se que 44,1% dos cães estudados estavam infectados, quer pelo nemátode *Dirofilaria immitis* ou pelas bactérias *Anaplasma phagocytophilum* e *Mycoplasma* spp. Observou-se que um total de 73% da população analisada contactou com agentes parasitários, pois apresentava anticorpos contra estes. Evidenciou-se a presença de anticorpos contra o piroplasma *Babesia canis* e contra as bactérias *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*. Esta é uma prevalência elevada e que carece de um estudo mais aprofundado de modo a caracterizar a endemicidade destes parasitas na área. Uma vez que os parasitas hemáticos apresentam um factor em comum, o modo de transmissão por vectores e de acordo com a baixa adesão aos hábitos de profilaxia ectoparasiticida observada nos detentores inquiridos neste estudo, recomenda-se uma maior consciencialização dos detentores para os danos que uma picada de mosquito/carraça pode acarretar. Frisa-se a importância dos médicos veterinários na educação dos detentores e promoção do conceito One Health, idealmente aliados às Câmaras Municipais e Juntas de Freguesia para uma maior cobertura da população.

9. BIBLIOGRAFIA

- [AHS] American Heartworm Society. 2014. Orientações atuais para prevenção, diagnóstico e controle da Dirofilariose (*Dirofilaria immitis*) em cães [internet]. Wilmington, DE: American Heartworm Society; [acedido em 2019 Jul 1]. <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>
- Alexandre N. 2005. Estudo clínico e epidemiológico de febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Alho AM, Nabais J, Madeira de Carvalho L. 2013. A importância da Técnica de Baermann na clínica de pequenos animais. *Clínica Animal*. 3:28-31
- Alho AM, Schnyder M, Schaper R, Meireles J, Belo S, Deplazes P, Madeira de Carvalho L. 2016. Seroprevalence of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen and parasite-specific antibodies in dogs from Portugal. *Parasitology Research*. 115:2567-2572
- Alho AMPVA. 2017. *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum*: Epidemiology and impact of major heartworms in carnivores in Portugal [tese de doutoramento]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Almeida C. 2010. Prevalência de dirofilariose felina na região do Sado [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Almeida VCT. 1997. Ixodídeos da ilha da Madeira, contribuição ao seu estudo [tese de doutoramento]. Évora: Universidade de Évora
- Al-Sabi MNS, Kapel CMO, Johansson A, Espersen MC, Koch J, Willesen JL. 2013. A coprological investigation of gastrointestinal and cardiopulmonary parasites in hunting dogs in Denmark. *Veterinary Parasitology* 196:366-372
- Areekul P, Putaportip C, Pattanawong U, Sitthicharoenchai P, Jongwutiwes S. 2010. *Trichuris vulpis* and *T. trichiura* infections among schoolchildren of a rural community in northwestern Thailand: the possible role of dogs in disease transmission. *Asian Biomedicine* 4(1):49-60
- Aung MPPTH, Hino A, Oo KM, Win KK, Maruyama H, Htike WW, Nagayasu E. 2018. Prevalence and associated risk factors of *Strongyloides stercoralis* infection in Lower Myanmar. *Tropical Medicine and Health*. 46:43
- Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V. 2001. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Parasitology* 87(3):606-611
- Bowman, DD. 2014. Georgis' Parasitology for Veterinarians. 10ª edição. St Louis, Missouri: Elsevier Saunders
- Braga MIFL. 2017. Prevalência e sazonalidade de parasitoses gastrointestinais, cardiovasculares e hemáticas em cães do distrito de Beja, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Breitschwerdt EB. 2007. Canine and Feline Anaplasmosis: Emerging Infectious Diseases. Proceedings of 2nd CVBD Symposium; Abr 25-28; Mazara del Vallo, Sicily. Italy: Bayer. p.6-14

- Caeiros APS. 2012. Detecção de *Babesia* spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no Distrito de Lisboa, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- [CMF] Câmara Municipal do Funchal. 2007. Funchal em Mapas e Números [internet]. Madeira, Portugal: Gabinete de Informação Geográfica, Departamento de Planeamento Estratégico, Câmara Municipal do Funchal [acedido em 2019 Jun 22]. www.cm-funchal.pt/images/municipio/edicoes_municipais/Funchal_Mapas_Numeros.pdf
- Cardoso CFF. 2019. Estudo da prevalência de infeção por *Dirofilaria immitis* em cães da Ilha da Madeira [dissertação de mestrado]. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
- Cardoso L, Mendão C, Madeira de Carvalho, L. 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors* 5:62
- Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 38:1337-1341
- Clairouin IMN. 2009. Estudo dos Culicídeos (Diptera: Culicidae) nos cemitérios das Ilhas da Madeira e do Porto Santo [dissertação de mestrado]. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa
- Cox FED. 1993. *Modern Parasitology: A Textbook of Parasitology*. 2ª edição. Oxford: Blackwell Science
- [CVBD] Companion Vector-Borne Diseases [internet]. 2019. Bayer; [acedido em 2019 Ago 21]. <http://www.cvbd.org/en/overview/>
- David de Moraes JA. 2010. The rise and decline of human hydatid disease in Portugal: historical and epidemiologic analysis. *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna* 17(4):246-256
- [DGV] Direcção Geral de Veterinária, DSMPUV. 2010. Resumo das Características do Medicamento: Guardian SR 3,4 mg/ml suspensão injectável para cães [internet]. Direcção Geral de Veterinária, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas; [acedido em 2019 Ago 11]. <http://medvet.dgav.pt/RCM/Index/1573>
- Di Cesare A, Crisi PE, Bartolini R, Ioro R, Talone T, Filippi L, Traversa D. 2015. Larval development of *Angiostrongylus vasorum* in the land snail *Helix aspersa*. *Parasitology Research* 114(10)
- Dohoo IR, McDonnell WN, Rhodes CS, Elazhary. 1998. Veterinary research and human health. *Can Vet J* 39:548-556
- Duarte MDAM. 2016. Infeção por agentes de Doenças Caninas Transmitidos por Vetores em Cães de Caça no concelho de Loures [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Eguía-Aguillar P, Cruz-Reyes A, Martínez-Maya JJ. 2005. Ecological analysis and description of the intestinal helminths presente in dogs in Mexico City. *Veterinary Parasitology* 125:139-146

- [ESCCAP] European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. 2017. Guideline 01 Third Edition – July 2017: Worm Control in Dogs and Cats. 3ª edição [internet]. United Kingdom: ESCCAP; [acedido em 2019 Ago 1]. https://www.esccap.org/uploads/docs/0x0o7jda_ESCCAP_Guideline_01_Third_Edition_July_2017.pdf
- [ESCCAP] European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. 2018a. Guideline 06 Second Edition – February 2018: Control of Intestinal Protozoa in Dogs and Cats. 2ª edição [internet]. United Kingdom: ESCCAP; [acedido em 2019 Ago 1]. https://www.esccap.org/uploads/docs/xnqpgr2_0701_ESCCAP_Guideline_GL6_v7_1p.pdf
- [ESCCAP] European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. 2018b. Guideline 03 Sixth Edition – March 2018: Control of Ectoparasites in Dogs and Cats. 6ª edição [internet]. United Kingdom: ESCCAP; [acedido em 2019 Ago 14]. https://www.esccap.org/uploads/docs/v5sc2etz_0720_ESCCAP_Guideline_GL3_update_v8_1p.pdf
- [ESCCAP] European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. 2019. Guideline 05 Third Edition – March 2019: Control of Vector-Borne Diseases in Dogs and Cats. 3ª edição [internet]. United Kingdom: ESCCAP; [acedido em 2019 Jul 15]. https://www.esccap.org/uploads/docs/i3m71z28_0775_ESCCAP_Guideline_GL5_v8_1p.pdf
- [ESDA] European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis. 2017. Guidelines for Clinical Management of Canine Heartworm Disease [internet]. ESDA; [acedido em 2019 Jul 27]. <https://www.esda.vet/wp-content/uploads/2017/11/GUIDELINES-FOR-CLINICAL-MANAGEMENT-OF-CANINE-HEARTWORM-DISEASE.pdf>
- Félix LIB. 2015. Parasitoses Gastrointestinais e Cardiopulmonares em Cães. Estudo epidemiológico em canis de Portugal Continental [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Fernandes MJP. 2009. Riscos no Concelho da Ribeira Brava - Movimentos de Vertente. Inundações/Cheias Rápidas [dissertação de mestrado]. Coimbra: Faculdade de Economia, Faculdade de Letras e Faculdade de Ciências - Universidade de Coimbra
- Ferreira FS, Pereira-Baltasar P, Parreira R, Padre L, Vilhena M, Távora Távora L, Atouguia J, Centeno-Lima S. 2011. Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology* 179:242-245
- Ferreira MF. 2008. Parasitoses caninas transmitidas por ixodídeos [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Foreyt WJ. 2001. *Veterinary Parasitology: Reference Manual*. 5ª edição. Iowa: Backwell Publishing
- Fournier P and Raoult D. 2007. Bacteriology, Taxonomy and Phylogeny of *Rickettsia*. Em Raoult D and Parola P, editores. *Rickettsial Diseases*. Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, Informa Healthcare; p.1-13
- Fukumoto S, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. 2005. Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int J Parasitol*. 35:1031-1035
- Goldstein EJC and Abrahamian FM. 2017. Infections from Pets. Em: *Infectious Diseases, Volume One*. 4ª edição. Elsevier. Section 3 Special Problems in Infectious Disease Practice: Environmental and Occupational Factors; p.656-662

- Gomes BAJ. 2009. Doenças parasitárias do cão transmitidas por insectos culicídeos e psicodídeos no Funchal e em Barcelona [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Gonçalves SS. 2017 Novembro 28. Funchal possui 18 mil cães e 8 mil gatos de companhia – A CMF realiza inventário porta-a-porta desde Novembro de 2016. Diário de Notícias [internet]. [acedido em 2019 Ago 25]. <https://www.dnoticias.pt/imprensa/hemeroteca/diario-de-noticias/funchal-possui-18-mil-caes-e-8-mil-gatos-de-companhia-EL2418547>
- Gouveia de Oliveira A. 2014. Estudos Analíticos - Bioestatística Descodificada. 2ª edição. Lousã: Lidel
- Greig B and Armstrong PJ. 2006. Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). Em Greene C, editor. Infectious diseases of the dog and cat. 3ª edição. Philadelphia: Saunders, Elsevier; p. 219-224
- Harrus S and Waner T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. The Veterinary Journal. 187:292–296
- Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Terlford III SR, Krause PJ, Persing DH. 2000. Babesiosis. Clinical Microbiology Reviews. 13(3):451-469
- [INE] Instituto Nacional de Estatística. 2012. Censos 2011 Resultados Definitivos - Região Autónoma da Madeira [internet]. Lisboa, Portugal: Instituto Nacional de Estatística, I.P. [acedido em 2019 Jun 22]. <https://estatistica.madeira.gov.pt/download-now-3/social-gb/popcondsoc-gb/popcondsoc-censos-gb/popcondsoc-censos-publicacoes-gb/finish/221-censos-publicacoes/559-censos-ram-2011.html>
- [IPMA] Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2015-2016. O Clima – Acompanhamento do clima – Funchal [internet]. Portugal: Instituto Português do Mar e da Atmosfera [acedido em 2019 Jun 22]. www.ipma.pt/pt/oclima/monitorizacao/index.jsp?selTipo=g&selVar=rr&selAna=to&selAno=2015#
- [IPMA] Instituto Português do Mar e da Atmosfera. 2019. Normais Climatológicas - 1971-2000 - Temperatura do ar - Funchal, Madeira [internet]. Portugal: Instituto Português do Mar e da Atmosfera [acedido em 2019 Jun 22]. <http://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/1971-2000/#522>
- Irwin PJ. 2007. PUPS, PCRs and Platelets: *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections of Australia and overseas. Em: Proceedings of the 32nd World Small Animal Veterinary Association Congress; 19-23 Aug; Sydney. Australia: World Small Animal Veterinary Association
- Ivanov A, Tsachev I. 2008. *Hepatozoon canis* and Hepatozoonosis in the dog. Trakia Journal of Sciences. 6(2):27-35
- Jacobs D, Fox M, Gibbons L, Hermosilla C. 2016. Principles of Veterinary Parasitology. United Kingdom: Wiley Blackwell
- Khante GS, Khan LA, Bodkhe AM, Suryawanshi PR, Majed MA, Suradkar US, Gaikwad SS. 2009. Epidemiological survey of Gastro-intestinal Parasites of Non-descript dogs in Nagpur City. Veterinary World 2(1):22-23
- Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. 2008: Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. J Vet Intern Med. 22:1289-1295

- Lasta CS. 2008. Hepatozoonose canina [monografia para obtenção do certificado de Residência Médica em Patologia Clínica Veterinária]. Porto Alegre: Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Hospital de Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Leal SMF. 2015. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. em cães do Distrito de Bragança, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Little SE, Johnson EM, Lewis D, Jaklitsch RP, Payton ME, Blagburn BL, Bowman DD, Moroff S, Tams T, Rick L, Aucoin D. 2009. Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Veterinary Parasitology* 166:144-152
- Machado GP, Dagnone AS, Silva BF. 2010. Anaplasmoses Trombocítica canina – Uma breve revisão. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. VIII(15)
- Machado MCS. 2019. Parasitismo gastrointestinal em cães frequentadores de espaços públicos da Freguesia de Mafra, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P. 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonomes* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors* 6:48
- Maia C, Almeida B, Coimbra M, Fernandes MC, Cristóvão JM, Ramos C, Martins A, Martinho F, Silva P, Neves N, Nunes M, Vieira ML, Cardoso L, Campino L. 2015. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from Southern Portugal. *Parasites & Vectors*. 8:138
- Maia C, Maurício I, Campino L, Cardoso L, Madeira de Carvalho L, Afonso O, Neves R, Vila de Brito T. 2011. Primeiro relatório regular da LEISHnet: ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses. *Veterinary Medicine Jan/Fev*:22-26
- Martínez-Moreno FJ, Hernández S, López-Cobos E, Becerra C, Acosta I, Martínez-Moreno A. 2007. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Veterinary Parasitology* 143:7-13
- Mateus TSL. 2015. Contribuição para o estudo da equinococose-hidatidose na população animal em Portugal: Caracterização dos genótipos e avaliação epidemiológica [tese de doutoramento]. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto
- Matos MSLSM. 2013. Hábitos de desparasitação em animais de companhia: Inquérito a proprietários de cães e gatos, da Região de Lisboa, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Melo ACMS. 2017. Parasitoses gastrointestinais e pulmonares em canídeos e felídeos da região Oeste de Portugal Continental [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Merlo RH, Núñez FA, Durán LP. 2007. Potencial zoonótico de las infecciones per helmintos intestinales en perros callejeros de Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Trop* 59(3):234-240. Espanhol.
- Morchón R, Carretón E, González-Miguel J, Mellado-Hernández I. 2012. Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – new distribution trends. *Frontiers in Physiology* 3(196)

- Moro KK and Abah AE. 2019. Epizootiology of zoonotic parasites of dogs in Abua area of Rivers State, Nigeria. *Veterinary and Animal Science* 7:100045
- Moron-Soto M, Gutierrez L, Sumano H, Tapia G, Alcala-Canto Y. 2017. Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs. *Parasites & Vectors* 10:52
- Moura ALB. 2016. Parasitoses relevantes e emergentes do cão e do gato: introdução [editorial]. Monografia Boletim Técnico Meril. p.2
- Murata T, Inoue M, Tateyama S, Taura Y, Nakama S. 1993. Vertical Transmission of *Hepatozoon canis* in Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 55(5):867-868
- Nelson RW and Couto CG. 2009. *Small Animal Internal Medicine*. 4ª edição. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier
- Novacco M, Meli M, Gentilini F, Marsilio F, Ceci C, Pennisi M. 2010. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic *Mycoplasma* infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*. 142(3-4):276-284
- Nunes MRF. 2014. Rastreio de formas parasitárias em fezes de cães recolhidas em espaços públicos na cidade de Beja [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa
- Oliveira AM, Diaz S, Santos C, Bourdeau P, Pereira da Fonseca IM. 2010. Geographical distribution, clinical presentation, treatment and prevention of canine leishmaniosis in Portugal: a 2007 field survey. *RPVC* 109(573-576):21-29
- Palmer CS, Thompson RCA, Traub RJ, Rees R, Robertson ID. 2008. National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Veterinary Parasitology* 151:181-190
- Pereira A, Martins A, Brancal H, Vilhena H, Silva P, Pimento P, Diz-Lopes D, Neves N, Coimbra M, Alves AC, Cardoso L, Maia C. 2016. Parasitic zoonoses associated with dogs and cats: a survey of Portuguese pet owners' awareness and deworming practices. *Parasites & Vectors* 9:245
- Pereira SRT. 2010. Estudo transversal de Dirofilariose Canina na Região da Madeira, Portugal [relatório final de estágio]. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto
- [PORDATA] Pordata, Base de Dados Portugal Contemporâneo [internet] 2019. Portugal: Fundação Francisco Manuel dos Santos [acedido em 2019 Jun 17]. <https://www.pordata.pt/O+que+sao+NUTS>
- Raza A, Rand J, Qamar AG, Jabbar A, Kopp S. 2018. Gastrointestinal Parasites in Shelter Dogs: Occurrence, Pathology, Treatment and Risk to Shelter Workers. *Animals* 8:108
- Ribeiro Campos D, Oliveira LC, Siqueira DF, Perin LR, Campos NC, Aptekmann KP, Martins IVF. 2016. Prevalence and risk factors associated with endoparasitosis of dogs and cats in Espírito Santo, Brazil. *Acta Parasitologica* 61(3):544-548
- Riggio F, Mannella R, Ariti G, Perrucci S. 2013. Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Veterinary parasitology* 193:78-84
- Roberts L and Janovy Jr J. 2009. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' *Foundations of Parasitology*. 8ª edição. New York, USA: McGraw-Hill

- Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30:1369-1377
- Sainz A, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*. 8:75
- Sanderson SL. 2010. Body Condition Score Techniques for Dogs. *Procedures Pro NAVC Clinician's Brief*. 3:13-16
- Santa-Ana M, Khadem M, Capela R. 2006. Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *J Med Entomol*. 43(1):104-106.
- Santos AS. 2019. Doenças associadas a carraças: Anaplasmoze, Ehrlichiose e Neoehrlichiose. Em: Núncio MS, Alves MJ, editores. Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores. 2ª edição. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. p. 129-133
- Santos DJF. 2013. Caracterização do Parasitismo de Ungulados Silvestres e aspectos da sua Epidemiologia na Tapada Nacional de Mafra, Concelho de Mafra, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Santos JPGAB. 2014. Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Santos-Gomes G, Pereira da Fonseca IM. 2008. Leishmaniose Canina. Lisboa: Chaves Ferreira.
- Seixas R, Alho AM, Guerra D, Madeira de Carvalho L. 2011. Doenças caninas de transmissão vectorial: uma picada com muitas consequências! *Veterinary Medicine*. 13:18-35
- Silva CCFP. 2016. Gastrointestinal parasites in dogs – Prevalence and deworming protocols in the District of Coimbra, Portugal [dissertação de mestrado]. Coimbra: Escola Universitária Vasco da Gama
- Silva CG. 2018. Rastreio de parasitas gastrointestinais e pulmonares de canídeos domésticos e silvestres no Distrito de Vila Real, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Silva IPC. 2011. Estudo de hemoparasitas transmitidos por vectores, em cães de canil, Setúbal, Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa
- Silva MM, Santos AS, Formosinho P, Bacellar F. 2006. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Med Port*. 19:39-48
- Simões PB, Cardoso L, Araújo M, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. 2011. Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs – first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors* 4:50
- Solano-Gallego L, Baneth G. 2011. Babesiosis in dogs and cats – Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*. 181:48-60
- [SPAD] Sociedade Portuguesa dos Animais Domésticos. 2012-2019. Madeira, Portugal: Sociedade Portuguesa dos Animais Domésticos [acedido em 2019 Jun 15]. <http://spad-funchal.blogspot.com/>

- Springer A, Montenegro VM, Schicht S, Vrohvec MG, Pantchev N, Balzer J, Strube C. 2019. Seroprevalence and Current Infections of Canine Vector-Borne Diseases in Costa Rica. *Front. Vet. Sci.* 6:164
- Stegeman JR, Birkenheuer AJ, Kruger JM, Breitschwerdt EB. 2003. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 222(7):959-963
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2016. *Veterinary Parasitology*. 4ª edição. United Kingdom: Willey Blackwell
- Teixeira D, Abreu C. 2003. Biodiversidade Madeirense: Avaliação e Conservação - Moluscos Terrestres da Ponta de São Lourenço e Ilhéus Adjacentes [internet]. Madeira, Portugal: Direcção Regional do Ambiente; [acedido em 2019 Jun 30]. https://ifcn.madeira.gov.pt/images/Doc_Artigos/Divulgacao/publicacoes/livros/Moluscos.pdf
- Tekele GM. 2003. Aspects of the morphology, life cycle and epidemiology of *Toxocara* species and *Toxascaris leonina* [dissertação de mestrado]. África do Sul: University of the Free State
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs, OF. 1979. Diagnosing helminthiasis through coprological examination. Beerse, Belgium: Janssen Research Foundation
- Thompson R, Palmer CS, O'Handley R. 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J* 177:18-25
- Traversa D. 2011. Are paying too much attention to cardio-pulmonary nematodes and neglecting old-fashioned worms like *Trichuris vulpis*? *Parasites & Vectors.* 4:32
- Valladares E. 2016. Factores chave para um controlo antiparasitário com eficácia em cães e gatos [editorial]. *Monografia Boletim Técnico Merial.* p.3
- Valladares-Salmeron B, Martín-Alonso A, Valladares-Salmeron M, Martin-Carrillo N, Garcia-Livia K, Valladares B, Foronda P. 2016. Pathogens in domestic cats and dogs in the Canary Islands, Spain [resumo]. *International Journal of Infectious Diseases* 53S:4-163
- Vidal R, Alho AM, Rocha H, Gomes L, Carneiro J, Madeira de Carvalho L. 2014. Rastreio nacional de doenças caninas de transmissão vectorial em canídeos militares da Guarda Nacional Republicana. *Veterinary Medicine.* 16(96):34-38
- Vieira ALNMP. 2016. *Dirofilariose Humana: Zoonose negligenciada ou desconhecida?* [dissertação de mestrado]. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto
- VisitMadeira [internet] 2019. Madeira, Portugal: Direcção Regional do Turismo da Madeira [acedido em 2019 Jun 17]. <http://www.visitmadeira.pt/pt-pt/a-madeira/madeira>
- Vrhovc MG, Pantchev N, Failing K, Bauer C, Travers-Martin N, Zahner H. 2017. Retrospective Analysis of Canine Vector-borne Diseases (CVBD) in Germany with Emphasis on the Endemicity and Risk Factors of Leishmaniosis. *Parasitol Res* 116:S131-S144
- Walker DH, Ismail N, Olano JP, Valbuena G, McBride J. 2007. Pathogenesis, Immunity, Pathology and Pathophysiology in Rickettsial Diseases. Em Raoutl D and Parola P, editores. *Rickettsial Diseases*. Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, Informa Healthcare; p.15-25

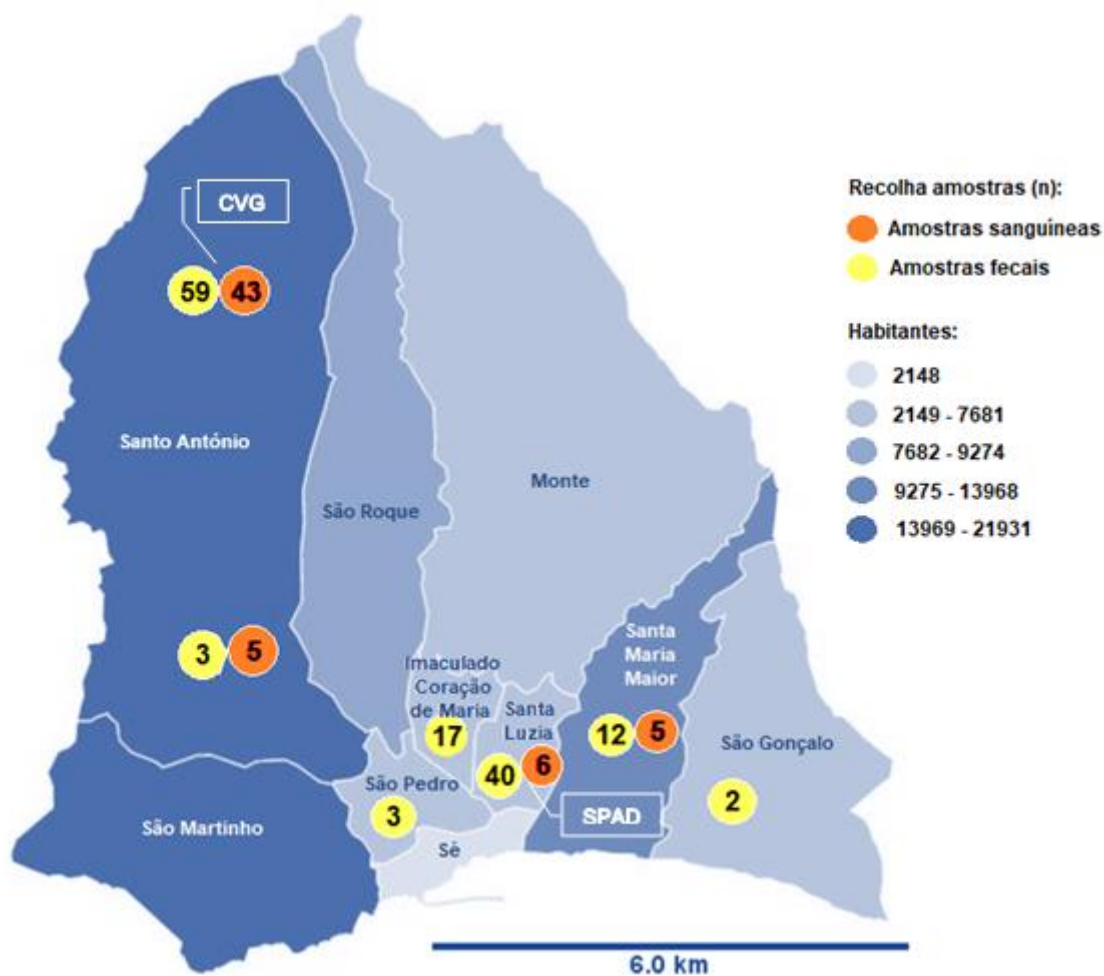
- Warner T and Harrus S. 2000. Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). Em L. E. Carmichael, editor. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. [Internet]. New York, USA: Internacional Veterinary Information Service (www.ivis.org); [acedido em 2019 Set 2]. www.ivis.org/document/no.a0108.0400
- [WHO and WSPA] World Health Organization and World Society for the Protection of Animals. 1990. Guidelines for Dog Population Management [internet]. Geneva: World Health Organization and World Society for the Protection of Animals [acedido em 2019 Ago 25]. <https://who.int/iris/handle/10665/61417>
- [WHO] World Health Organization [internet]. 2017. One Health [acedido em 2019 Set 1]. www.who.int/features/qa/one-health/en/
- Zajac AM and Conboy GA. 2012. Veterinary Clinical Parasitology. 8ª edição. West Sussex, United Kingdom: Willey-Blackwell

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1 – Localização da cidade do Funchal, Ilha da Madeira, Portugal



10.2. ANEXO 2 – Mapa das freguesias do Funchal com respectiva densidade populacional e distribuição das amostras recolhidas de cães (sanguíneas e fecais) (adaptado de CMF 2017)



10.3. ANEXO 3 – Localização SPAD e CVG

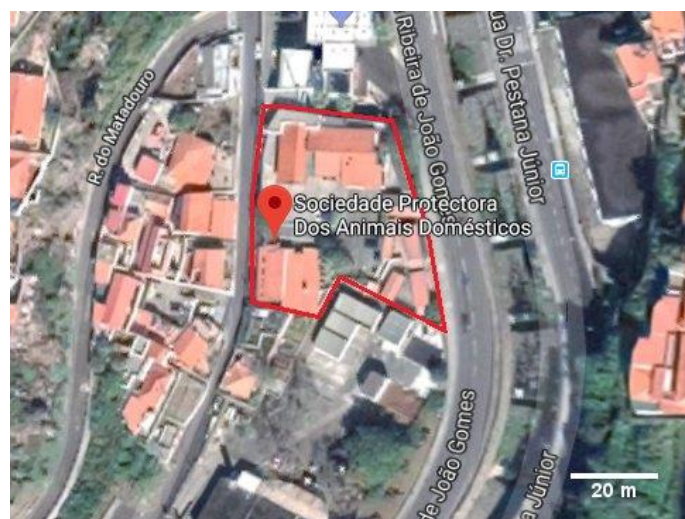


Figura 1 - Vista aérea SPAD, na freguesia de Santa Luzia



Figura 2 - Vista aérea CVG, no alto da freguesia de Santo António

10.4. ANEXO 4 – Inquérito realizado no grupo de cães com detentor durante a recolha das amostras fecais



Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa
Dissertação de Mestrado Integrado Medicina Veterinária



Betina Gouveia Gomes
(e-mail: betinagouveiagomes@gmail.com)

Rastreo Parasitológico em cães na Ilha da Madeira

Os parasitas presentes nos animais de companhia têm elevada relevância clínica e são importantes para a saúde pública tanto veterinária como humana.

As amostras recolhidas neste estudo serão analisadas sem custos para o detentor do animal no laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Uma vez que cada amostra é identificada e numerada os resultados são posteriormente transmitidos ao médico veterinário assistente, podendo ser de utilidade para possíveis intervenções veterinárias.

Todos os dados de recolha manter-se-ão em sigilo, publicamente apenas serão transmitidos os resultados de parasitas encontrados nas amostras e informações gerais.

Encontro-me disponível para o esclarecimento de alguma dúvida ou caso desejem outras informações. Agradeço a vossa colaboração e disponibilidade.

Nome do Detentor: _____

Contacto (nº telefone ou e-mail): _____

Nome Animal: _____

*Preenchimento opcional, sendo a informação confidencial e apenas necessária para transmissão dos resultados

Identificação da Amostra: _____ Data da Recolha: _____

Onde vive o animal (localidade/freguesia)? _____

Porte animal: Pequeno ☐ Médio ☐ Grande ☐

Sexo: Macho ☐ Fêmea ☐

Idade: _____

Raça: _____

Condição Corporal (magro, ideal, acima do peso, etc): _____

Quando foi a última vez que fez a desparasitação externa? _____

Qual o produto que utilizou? _____

E a última desparasitação interna? _____

Qual o produto? _____

O seu cão vive com outros animais? _____ Se sim, quais? _____

O seu cão tem acesso a jardins, parques ou espaços partilhados com outros animais?

Tipo de alimentação (ração comercial, comida caseira, alimentos crus, etc.): _____

Teve doenças anteriores? _____ Se sim, quais? _____

10.5. ANEXO 5 – Procedimento das técnicas laboratoriais

Técnica de Flutuação pelo método de Willis (adaptado de Taylor et al. (2016)):

- a. Homogeneizou-se com uma vareta cerca de 2 gr de fezes em solução saturada de sacarose
- b. Filtrou-se a suspensão através de um coador para um tubo de ensaio, com o auxílio de um funil, até formar um menisco convexo no topo do tubo
- c. Colocou-se de imediato uma lamela no topo do tubo de ensaio.
- d. Aguardou-se cerca de 15 min para que as formas parasitárias ascendessem e aderissem à lamela
- e. Retirou-se cuidadosamente a lamela e apôs-se numa lâmina de vidro
- f. Observou-se ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40 na ampliação de 100x, para detecção dos parasitas, e 400x, para diferenciação e medição dos mesmos (ocular de 10x e objectiva de 10x e 40x, respectivamente)

Técnica de Sedimentação Natural (adaptado de Taylor et al. (2016)):

Após terminar a técnica de flutuação:

- a. Retirou-se o sobrenadante do tubo de ensaio
- b. Recolheu-se algumas gotas de sedimento com uma pipeta de Pasteur
- c. Adicionou-se uma gota de corante de azul de metileno ao sedimento e homogeneizou-se
- d. Colocou-se uma lamela sobre o sedimento e observou-se ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40 com a ampliação de 100x (ocular de 10x e objectiva de 10x).

Técnica de Baermann (adaptado de Taylor et al. (2016)):

Para a realização da técnica, recorreremos à adaptação sugerida por Taylor et al. (2016) com recurso a um copo cónico. Como proposto executou-se os seguintes passos:

- a. Colocou-se uma pequena quantidade de fezes, com o tamanho aproximado de uma noz (5 a 15g), envoltas em gaze e suspendeu-se no topo de um copo cónico
- b. Preencheu-se o copo com água tépida até submersão completa das fezes
- c. Aguardou-se 24 horas para a migração das larvas L1 a partir das fezes e para a sua deposição no fundo do copo
- d. Eliminou-se o conjunto das fezes e gaze e o sobrenadante
- e. Retirou-se umas gotas do fundo do copo, com o auxílio de uma pipeta de Pauster, e colocou-se entre lâmina e lamela
- f. Observou-se ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40 na ampliação de 100x (ocular de 10x e objectiva de 10x)

Esfregaço fecal corado pelo método de Zhiel-Neelsen modificado (adaptado de Casemore et al. (1985)):

Para a realização do esfregaço fecal e após homogeneização da amostra (adicionando se necessário 1 a 2 gotas de água), recolheu-se uma pequena porção com o auxílio de uma vareta de vidro; com a vareta em posição paralela a uma lâmina de vidro e realizando movimentos rotativos distribuiu-se uma camada homogénea por toda a área da lamina.

Deixou-se secar muito bem ao ar livre durante 24 horas e iniciou-se a coloração de Ziehl-Neelsen (adaptado de Casemore et al. 1985):

- a. Cobriu-se o esfregaço com metanol durante 1 minuto para fixar amostra
- b. Cobriu-se com Fucsina durante 10 minutos e de seguida lavou-se com água corrente
- c. Lavou-se a lâmina com Álcool Clorídrico a 1% e lavou-se novamente com água corrente
- d. Cobriu-se com Verde Malaquite 0,4% durante 30 segundos e lavou-se com água corrente
- e. Colou-se a lâmina ao alto para secar durante 24 horas
- f. Observou-se no microscópio óptico Olympus® modelo BX40 com óleo de imersão na ampliação de 1000x (ocular de 10x e objectiva de 100x)

Seguindo o método de observação em ziguezague, de cima para baixo e da esquerda para a direita, sempre com início na periferia, analisou-se 50 campos por cada esfregaço fecal.

Técnica de Knott modificada (adaptado de ESDA (2017)):

As amostras de sangue em EDTA foram submetidas ao seguinte processo:

- a. Num tubo de centrífuga de fundo cónico, misturou-se 1 mL de sangue total e 9 mL de formol a 2%.
- b. Tapou-se o tubo e homogeneizou-se no agitador (LABINCO® modelo L46 Vortex Mixer).
- c. Centrifugou-se a 1500 rotações por minuto durante 3 minutos (JP Selecta® modelo Centronic).
- d. Eliminou-se o líquido sobrenadante.
- e. Adicionou-se ao sedimento uma gota de Azul-de-metileno diluído na proporção de 1:1.000 em água destilada neutra.
- f. Transferiu-se uma gota da mistura para uma lâmina e aplicou-se uma lamela.
- g. Examinou-se ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40, a preparação em duplicado, primeiro com uma ampliação de 100x, para detecção de microfilárias, e de seguida com uma ampliação de 400x, para diferenciação (ocular de 10x e objectiva de 10 e 40x, respectivamente).

Esfregaço de sangue corado pelo método de Giemsa:

A partir do sangue em EDTA efectuou-se dois esfregaços de sangue por cada amostra. Primeiramente, para a realização do esfregaço colocou-se uma gota de sangue numa lâmina de vidro, identificada com o número da amostra, e com a ajuda de uma lamela, estendeu-se a gota de sangue de modo a formar uma película muito fina de sangue. Deixou-se as lâminas a secar à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se à coloração de um dos esfregaços pelo método de Giemsa, armazenando o segundo esfregaço como suplente. Para a coloração pelo método de Giemsa:

- a. Cobriu-se o esfregaço com metanol durante 1 minuto para fixar amostra
- b. Corou-se com Giemsa durante 1 minuto e lavou-se com água corrente
- c. Observou-se ao microscópio óptico Olympus® modelo BX40 com a ampliação de 400x e com óleo de imersão com a ampliação de 1000x (ocular de 10x e objectiva de 40x e 100x, respectivamente).

Pesquisa de anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum* pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI) - MegaFLUO® *Anaplasma phagocytophilum*

Para a detecção de anticorpos (Ac) caninos anti-*Anaplasma phagocytophilum*, da classe Ig G, as lâminas do substrato fornecidas no *kit* comercial consistem em pocilhos contendo neutrófilos caninos mistos, dos quais 20-30% estão infectados com *A. phagocytophilum*, contendo as características mórulas citoplasmáticas.

Uma reacção positiva é observada como uma mórula com fluorescência verde-maçã bem definida dentro das células infectadas. O limiar de positividade foi determinado pela diluição em que existia positividade e foi utilizado o recomendado pelo laboratório Megacor: diluição de 1:50. Os títulos de IgG de 1:50 ou superiores são considerados como uma reflexão da infecção, num tempo indeterminado.

De acordo com as instruções do fabricante, o *kit* encontrava-se armazenado refrigerado (entre 2-8°C) e após os componentes do *kit* atingirem a temperatura ambiente (20-25°C) iniciou-se o procedimento de acordo com as instruções do laboratório Megacor® (Megacor® Diagnostik GmbH, Hörbranz, Áustria):

- a. Removeu-se a lâmina do invólucro e identificou-se com o número das amostras
- b. Preparou-se as diluições iniciais para todos os soros não testados (diluição de 1:50 (5 µl amostra + 245 µl de PBS))
- c. Adicionou-se para cada lâmina 20 µl do controlo positivo num poço e 20 µl do controlo negativo num outro poço (os controlos são fornecidos pelo fabricante e compõe o *kit* comercial, encontrando-se prontos a ser utilizados)
- d. Aplicou-se 20 µl de cada diluição dos soros não testados no pocilho associado
- e. Colocou-se a lâmina numa câmara húmida e incubou-se durante 30 minutos a 37°C
- f. Removeu-se a câmara húmida da incubadora e lavou-se os pocilhos com PBS. Eliminou-se as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetiu-se esta lavagem mais 2 vezes, por 5 minutos cada. Retirou-se as lâminas e apoiou-se a aresta da lâmina sobre papel absorvente, gentilmente batendo para retirar o líquido em excesso.
- g. Adicionou-se imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada pocilho. Colocou-se as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação foi feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
- h. Lavou-se as lâminas como no passo f.
- i. Adicionou-se 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocou-se cuidadosamente sobre a lâmina
- j. Observou-se as lâminas ao Microscópio de Fluorescência Olympus® modelo BX50F, numa ampliação de 400x (ocular de 10x e objectiva de 40x), comparando cada pocilho com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos pocilhos de controlo Positivo e Negativo.

Pesquisa de anticorpos anti-*Babesia canis* pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI) - MegaFLUO® *Babesia canis*

Para a detecção de anticorpos caninos anti-*Babesia canis*, da classe Ig G, as lâminas do substrato fornecidas no *kit* comercial consistem em pocilhos contendo eritrócitos caninos fixados, infectados com *B. canis*, na forma dos característicos merozoitos citoplasmáticos.

Uma reacção positiva é visualizada como um merozoito de fluorescência verde-maçã bem definido, dentro do citoplasma dos eritrócitos infectados em cada campo. O tamanho, aparência e densidade das inclusões (merozoitos) foi comparado com as reacções dos

controles positivo e negativo. O limiar de positividade foi determinado pela diluição em que existia positividade e foi utilizado o recomendado pelo laboratório Megacor: diluição de 1:20. Os títulos de IgG de 1:20 ou superiores são considerados como uma reflexão da infecção, num tempo indeterminado.

De acordo com as instruções do fabricante, o *kit* encontrava-se armazenado refrigerado (entre 2-8°C) e após os componentes do *kit* atingirem a temperatura ambiente (20-25°C) iniciou-se o procedimento de acordo com as instruções do laboratório Megacor® (Megacor® Diagnostik GmbH, Hörbranz, Áustria):

- a. Removeu-se a lâmina do invólucro e identificou-se com o número das amostras
- b. Preparou-se as diluições iniciais para todos os soros não testados (diluição de 1:20 (5 µl amostra + 95 µl de PBS))
- c. Adicionou-se para cada lâmina 10 µl do controlo positivo num poço e 10 µl do controlo negativo num outro poço (os controlos são fornecidos pelo fabricante e compõe o *kit* comercial, encontrando-se prontos a ser utilizados)
- d. Aplicou-se 10 µl de cada diluição dos soros não testados no pocilho associado
- e. Colocou-se a lâmina numa câmara húmida e incubou-se durante 30 minutos a 37°C
- f. Removeu-se a câmara húmida da incubadora e lavou-se os pocilhos com PBS. Eliminou-se as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetiu-se esta lavagem mais 2 vezes, por 5 minutos cada. Retirou-se as lâminas e apoiou-se a aresta da lâmina sobre papel absorvente, gentilmente batendo para retirar o líquido em excesso.
- g. Adicionou-se imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada pocilho. Colocou-se as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação foi feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
- h. Lavou-se as lâminas como no passo f.
- i. Adicionou-se 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocou-se cuidadosamente sobre a lâmina
- j. Observou-se as lâminas ao Microscópio de Fluorescência Olympus® modelo BX50F, numa ampliação de 400x (ocular de 10x e objectiva de 40x), comparando cada pocilho com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos pocilhos de controlo Positivo e Negativo.

Pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI) - MegaFLUO® *Ehrlichia canis*

Para a detecção de anticorpos caninos anti-*Ehrlichia canis*, da classe IgG, as lâminas do substrato fornecidas no *kit* comercial consistem em pocilhos contendo macrófagos caninos fixados (linha DH82), dos quais aproximadamente 20-30% estão infectados com *E. canis*, contendo as características mórulas citoplasmáticas.

Uma reacção positiva é observada como uma mórula de fluorescência verde-maçã bem definida dentro do citoplasma de 20-30% das células em cada campo. O limiar de positividade foi determinado pela diluição em que existia positividade e foi utilizado o recomendado pelo laboratório Megacor: diluição de 1:40. Os títulos de IgG de 1:40 ou superiores são considerados como uma reflexão da infecção, num tempo indeterminado.

De acordo com as instruções do fabricante, o *kit* encontrava-se armazenado refrigerado (entre 2-8°C) e após os componentes do *kit* atingirem a temperatura ambiente (20-25°C) iniciou-se o procedimento de acordo com as instruções do laboratório Megacor® (Megacor® Diagnostik GmbH, Hörbranz, Áustria):

- a. Removeu-se a lâmina do invólucro e identificou-se com o número das amostras

- b. Preparou-se as diluições iniciais para todos os soros não testados (diluição de 1:40 (5 µl amostra + 195 µl de PBS))
- c. Adicionou-se para cada lâmina 10 µl do controlo positivo num poço e 10 µl do controlo negativo num outro poço (os controlos são fornecidos pelo fabricante e compõe o *kit* comercial, encontrando-se prontos a ser utilizados)
- d. Aplicou-se 10 µl de cada diluição dos soros não testados no pocilho associado
- e. Colocou-se a lâmina numa câmara húmida e incubou-se durante 30 minutos a 37°C
- f. Removeu-se a câmara húmida da incubadora e lavou-se os pocilhos com PBS. Eliminou-se as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetiu-se esta lavagem mais 2 vezes, por 5 minutos cada. Retirou-se as lâminas e apoiou-se a aresta da lâmina sobre papel absorvente, gentilmente batendo para retirar o líquido em excesso.
- g. Adicionou-se imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada pocilho. Colocou-se as lâminas na câmara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação foi feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
- h. Lavou-se as lâminas como no passo f.
- i. Adicionou-se 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocou-se cuidadosamente sobre a lâmina

Observou-se as lâminas ao Microscópio de Fluorescência Olympus® modelo BX50F, numa ampliação de 400x (ocular de 10x e objectiva de 40x), comparando cada pocilho com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos pocilhos de controlo Positivo e Negativo.

Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia conorii* pela técnica da imunofluorescência indirecta (IFI) - MegaFLUO® *Rickettsia conorii*

Para a detecção de anticorpos caninos anti-*Rickettsia conorii*, da classe IgG, as lâminas do substrato fornecidas no *kit* comercial consistem em pocilhos contendo células infectadas por *R. conorii*. Em cada pocilho foi adicionado 20 µl da amostra, e por cada lâmina foi adicionado a um pocilho 20 µl do controlo positivo e a outro 20 µl do controlo negativo.

Uma reacção positiva é observada como numerosas estruturas intracitoplasmáticas do tipo cocobacilo, de fluorescência verde-maçã, regularmente coradas e bem definidas. O limiar de positividade foi determinado pela diluição em que existia positividade e foi utilizado o recomendado pelo laboratório Megacor, diluição de 1:64. Os títulos de IgG de 1:64 ou superiores são considerados como uma reflexão da infecção, num tempo indeterminado.

De acordo com as instruções do fabricante, o *kit* encontrava-se armazenado refrigerado (entre 2-8°C) e após os componentes do *kit* atingirem a temperatura ambiente (20-25°C) iniciou-se o procedimento de acordo com as instruções do laboratório Megacor® (Megacor® Diagnostik GmbH, Hörbranz, Áustria):

- a. Removeu-se a lâmina do invólucro e identificou-se com o número das amostras
- b. Preparou-se as diluições iniciais para todos os soros não testados (diluição de 1:64 (5 µl amostra + 315 µl de PBS))
- c. Adicionou-se para cada lâmina 20 µl do controlo positivo num poço e 20 µl do controlo negativo num outro poço (os controlos são fornecidos pelo fabricante e compõe o *kit* comercial, encontrando-se prontos a ser utilizados)
- d. Aplicou-se 20 µl de cada diluição dos soros não testados no pocilho associado
- e. Colocou-se a lâmina numa câmara húmida e incubou-se durante 30 minutos a 37°C
- f. Removeu-se a câmara húmida da incubadora e lavou-se os pocilhos com PBS. Eliminou-se as gotas remanescentes sacudindo a lâmina e repetiu-se esta lavagem

- mais 2 vezes, por 5 minutos cada. Retirou-se as lâminas e apoiou-se a aresta da lâmina sobre papel absorvente, gentilmente batendo para retirar o líquido em excesso.
- g. Adicionou-se imediatamente 1 gota de Conjugado anti-Cão-IgG-FITC em cada pocilho. Colocou-se as lâminas na camara húmida a incubar por mais 30 minutos a 37°C. A incubação foi feita no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
 - h. Lavou-se as lâminas como no passo f.
 - i. Adicionou-se 2 gotas de meio de montagem na lamela e colocou-se cuidadosamente sobre a lâmina

Observou-se as lâminas ao Microscópio de Fluorescência Olympus® modelo BX50F, numa ampliação de 400x (ocular de 10x e objectiva de 40x), comparando cada pocilho com a intensidade visual e aparência do padrão de fluorescência visualizado nos pocilhos de controlo Positivo e Negativo.

10.6. ANEXO 6 – Distribuição das amostras fecais e resultados obtidos nas técnicas coprológicas (n=136)

Nº Amostra	Grupo	Local Recolha/ Freguesia residência	Obs.	Data de Recolha	Técnica de Willis	Técnica de Sedimentação	Técnica de Baermann	Esfregaço Fecal Zhiel-Neelsen
1	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	Cães com detentor	Santo António		30/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	Cães com detentor	Santo António		30/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	Cães com detentor	Santo António		30/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
6	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
7	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
9	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
10	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
11	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
12	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
13	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
14	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
15	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
16	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
17	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
18	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
19	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
20	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
21	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
22	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Nº Amostra	Grupo	Local Recolha/ Freguesia residência	Obs.	Data de Recolha	Técnica de Willis	Técnica de Sedimentação	Técnica de Baermann	Esfregaço Fecal Zhiel-Neelsen
23	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
24	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
25	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
26	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
27	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
28	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
29	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp.	Neg.	Neg.	Neg.
30	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
31	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp. e ovos <i>Toxocara canis</i>	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp. e ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Neg.
32	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp. e ovos <i>Uncinaria stenocephala</i>	Neg.	Neg.	Neg.
33	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Neg.	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Neg.
34	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp. e ovos <i>Toxocara canis</i>	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp. e ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Neg.
35	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp.

Nº Amostra	Grupo	Local Recolha/ Freguesia residência	Obs.	Data de Recolha	Técnica de Willis	Técnica de Sedimentação	Técnica de Baermann	Esfregaço Fecal Zhiel-Neelsen
36	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
37	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
38	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp. e quistos <i>Giardia</i> spp.
39	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp.
40	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Ovos <i>Uncinaria stenocephala</i>	Neg.	Neg.	Neg.
41	Cães com detentor	Santa Maria Maior		27/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
42	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
43	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de tratamento/ quarentena	16/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
44	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
45	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
46	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
47	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
48	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
49	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
50	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
51	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
52	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
53	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Nº Amostra	Grupo	Local Recolha/ Freguesia residência	Obs.	Data de Recolha	Técnica de Willis	Técnica de Sedimentação	Técnica de Baermann	Esfregaço Fecal Zhiel-Neelsen
54	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
55	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
56	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Neg.
57	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Neg.
58	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
59	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
60	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
61	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Neg.	Neg.
62	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
63	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de Maternidade	28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
64	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
65	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de Maternidade	28/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp.	Neg.	Neg.	Neg.
66	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
67	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
68	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
69	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
70	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
71	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
72	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de Maternidade	28/12/2015	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp.	Oocistos <i>Cystoisospora</i> spp.	Neg.	Neg.
73	Cães assoc./canil	SPAD		28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
74	Cães assoc./canil	SPAD	Zona de Maternidade	28/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
75	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Nº Amostra	Grupo	Local Recolha/ Freguesia residência	Obs.	Data de Recolha	Técnica de Willis	Técnica de Sedimentação	Técnica de Baermann	Esfregaço Fecal Zhiel-Neelsen
76	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
77	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
78	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
79	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
80	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
81	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
82	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
83	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
84	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
85	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
86	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
87	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
88	Cães assoc./canil	CVG		29/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
89	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
90	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
91	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
92	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
93	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
94	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
95	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
96	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
97	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
98	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Ovos <i>Toxocara canis</i>	Neg.	Neg.

Nº Amostra	Grupo	Local Recolha/ Freguesia residência	Obs.	Data de Recolha	Técnica de Willis	Técnica de Sedimentação	Técnica de Baermann	Esfregaço Fecal Zhiel-Neelsen
99	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
100	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
101	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
102	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
103	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
104	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
105	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
106	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
107	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
108	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
109	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
110	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
111	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
112	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
113	Cães assoc./canil	CVG		23/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
114	Cães com detentor	Santa Maria Maior		30/12/2015	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
115	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
116	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
117	Cães com detentor	São Pedro		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
118	Cães com detentor	São Pedro		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
119	Cães com detentor	São Pedro		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
120	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Nº Amostra	Grupo	Local Recolha/ Freguesia residência	Obs.	Data de Recolha	Técnica de Willis	Técnica de Sedimentação	Técnica de Baermann	Esfregaço Fecal Zhiel-Neelsen
121	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
122	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
123	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
124	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
125	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
126	Cães com detentor	São Gonçalo		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
127	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
128	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
129	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
130	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
131	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
132	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
133	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp. e quistos <i>Giardia</i> spp.
134	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Quistos <i>Giardia</i> spp.
135	Cães com detentor	Imaculado Coração de Maria		28/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
136	Cães com detentor	São Gonçalo		27/04/2016	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Legenda: Cães assoc./canil – Cães residentes em associações/canis CVG – Canil do Vasco Gil, situado na freguesia de Santo António SPAD – Sociedade Portuguesa dos Animais Domésticos, situada na freguesia de Santa Luzia								

10.7. ANEXO 7 – Resultados obtidos nos inquéritos efectuados aos detentores aquando da recolha das amostras fecais
(n=37)

Nº Amostra	Data Recolha	Freguesia Residência Animal	Porte Animal	Sexo	Raça	Idade	Grupo Etário	Condição Corporal
2	30/12/2015	Santo António	Grande	Fêmea	Labrador	3 Anos	Adulto	4
3	30/12/2015	Santo António	Médio	Macho	SRD	2 Anos	Jovem Adulto	3
4	30/12/2015	Santo António	Pequeno	Macho	SRD	1 Ano	Jovem Adulto	3
21	27/12/2015	Santa Maria Maior	Pequeno	Macho	SRD	3 Anos	Adulto	3
22	27/12/2015	Santa Maria Maior	Médio	Macho	SRD	2 Anos	Jovem Adulto	3
23	27/12/2015	Santa Maria Maior	Médio	Fêmea	SRD	5 Meses	Em Crescimento	4
24	27/12/2015	Santa Maria Maior	Grande	Fêmea	Dálmata	7 Anos	Idoso	3
25	27/12/2015	Santa Maria Maior	Médio	Macho	SRD	6 Anos	Adulto	2
35	27/12/2015	Santa Maria Maior	Pequeno	Fêmea	SRD	2 Meses	Em Crescimento	3
36	27/12/2015	Santa Maria Maior	Grande	Macho	SRD	9 Anos	Idoso	4
38	27/12/2015	Santa Maria Maior	Grande	Macho	SRD	9 Anos	Idoso	3
39	27/12/2015	Santa Maria Maior	Médio	Fêmea	Basset hound	4 Anos	Adulto	3
40	27/12/2015	Santa Maria Maior	Pequeno	Fêmea	Teckel	5 Anos	Adulto	3
41	27/12/2015	Santa Maria Maior	Grande	Macho	Labrador	9 Anos	Idoso	5
114	30/12/2015	Santa Maria Maior	Grande	Macho	Labrador	6 Anos	Adulto	4
115	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Médio	Fêmea	SRD	8 Anos	Idoso	5
116	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Médio	Macho	SRD	5 Anos	Adulto	4
117	28/04/2016	São Pedro	Médio	Macho	SRD	5 Anos	Adulto	3
118	28/04/2016	São Pedro	Gigante	Fêmea	Grand Danois	3 Anos	Adulto	3
119	28/04/2016	São Pedro	Grande	Fêmea	SRD	8 Anos	Idoso	4
120	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Pequeno	Fêmea	Caniche Toy	5 Anos	Adulto	3
121	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Pequeno	Fêmea	SRD	7 Meses	Em Crescimento	3
122	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Pequeno	Macho	Caniche Toy	9 Anos	Idoso	3
123	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Grande	Fêmea	Leão da Rodésia	3 Anos	Adulto	3

Nº Amostra	Data Recolha	Freguesia Residência Animal	Porte Animal	Sexo	Raça	Idade	Grupo Etário	Condição Corporal
124	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Grande	Fêmea	SRD	4 Anos	Adulto	4
125	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Pequeno	Fêmea	SRD	1 Ano	Jovem Adulto	3
126	28/04/2016	São Gonçalo	Pequeno	Macho	Jack Russel	2 Anos	Jovem Adulto	sem resposta
127	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Médio	Fêmea	SRD	6 Anos	Adulto	4
128	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Grande	Fêmea	SRD	5 Anos	Adulto	5
129	27/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Pequeno	Macho	SRD	3 Anos	Adulto	4
130	28/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Pequeno	Macho	SRD	10 Anos	Idoso	3
131	28/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Grande	Macho	Labrador	8 Anos	Idoso	4
132	28/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Grande	Fêmea	Labrador	4 Anos	Adulto	3
133	28/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Pequeno	Macho	SRD	14 Anos	Idoso	3
134	28/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Grande	Fêmea	SRD	5 Anos	Adulto	3
135	28/04/2016	Imaculado Coração de Maria	Grande	Fêmea	Boxer	6 Anos	Adulto	3
136	27/04/2016	São Gonçalo	Pequeno	Macho	SRD	10 Anos	Idoso	4

Legenda: SRD – Sem Raça Definida

Continuação dos resultados obtidos nos inquéritos efectuados aos detentores aquando da recolha das amostras fecais

(n=37)

Nº Amostra	Desp. externa em dia?	Desp. interna em dia?	Co-habitação intra-espécie	Co-habitação interespécies	Acesso a espaços públicos partilhados por outros animais?	Tipo de Alimentação	Resultado pesquisa de parasitas
2	sim	sim	sim	Gatos e porquinhos da índia	Sim	Ração comercial	Neg.
3	sim	sim	sim	Gatos e porquinhos da índia	Sim	ração comercial	Neg.
4	sem resposta	sim	sim	Gatos e porquinhos da índia	Sim	ração comercial	Neg.
21	sim	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp. e quistos <i>Giardia</i> spp.
22	não	não	não	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
23	sim	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
24	não	não	não	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Quistos <i>Giardia</i> spp.
25	sem resposta	não	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
35	não	não	sim	Não	Não	sem resposta	Ovos <i>Toxocara canis</i> e oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp.
36	sim	sim	sim	Não	Não	ração comercial	Neg.
38	sim	sim	sim	Não	Não	ração comercial	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp. e quistos <i>Giardia</i> spp.
39	sim	sim	sim	Gatos	Não	ração comercial e comida caseira	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp.
40	não	sem resposta	sim	Gatos	Não	ração comercial e comida caseira	Ovos <i>Uncinaria stenocephala</i>
41	não	não	sim	Gatos	Não	ração comercial e comida caseira	Quistos <i>Giardia</i> spp.
114	não	não	sim	Gatos	Não	ração comercial	Neg.
115	sim	sem resposta	não	Não	Não	ração comercial	Neg.
116	não	não	não	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
117	sim	não	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
118	não	não	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
119	não	não	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
120	não	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.

Nº Amostra	Desp. externa em dia?	Desp. interna em dia?	Co-habitação intra-espécie	Co-habitação interespecies	Acesso a espaços públicos partilhados por outros animais?	Tipo de Alimentação	Resultado pesquisa de parasitas
121	não	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
122	não	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
123	sim	não	sim	Gatos errantes	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
124	sem resposta	sem resposta	sim	Gatos errantes	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
125	não	não	sim	Gatos errantes	Sim	ração comercial e comida caseira	Neg.
126	sem resposta	sem resposta	sem resposta	sem resposta	sem resposta	sem resposta	Neg.
127	sem resposta	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
128	sem resposta	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
129	sem resposta	sim	sim	Não	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
130	sim	sim	sim	Gatos	Sim	comida caseira	Quistos <i>Giardia</i> spp.
131	não	não	não	Gatos	Não	ração comercial e comida caseira	Neg.
132	não	não	sim	Não	Não	comida caseira	Neg.
133	sim	sim	sim	Gatos	Sim	comida caseira	Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp. e quistos <i>Giardia</i> spp.
134	não	não	sim	Não	Não	comida caseira	Quistos <i>Giardia</i> spp.
135	sem resposta	sim	não	Não	Não	ração comercial	Neg.
136	não	não	sim	Gatos	Não	comida caseira	Neg.

Legenda: Desp. – Desparasitação

10.8. ANEXO 8 – Distribuição das infecções parasitárias gastrointestinais por grupo de origem (com detentor vs residentes associações/canis) (n=136)

Resultado parasitário	Cães residentes em associações/canis (n)	Cães com detentor (n)	Total (n)
Negativo	82	27	109
<i>Toxocara canis</i>	5	0	5
<i>Uncinaria stenocephala</i>	0	1	1
<i>Cystoisospora</i> spp.	3	0	3
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	1	1
<i>Giardia</i> spp.	5	4	9
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp.	0	2	2
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cystoisospora</i> spp.	1	1	2
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>T. canis</i>	2	0	2
<i>Cystoisospora</i> spp. + <i>U. stenocephala</i>	1	0	1
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>T. canis</i>	0	1	1
Total	99	37	136

10.9. ANEXO 9 – Associações estatísticas entre os dados obtidos através dos inquéritos no grupo de cães com detentor e os resultados de parasitas gastrointestinais observados (n=37)

Factor		Nº total de amostras (n)	Nº de amostras positivas (n)	Prevalência (%) [IC 95%]	Associação estatística
Freguesia	Imaculado Coração de Maria	17	3	18% [6 – 41]	$\chi^2= 9.685$; g.l.=4; $p=0,046$
	Santa Maria Maior	12	7	58% [32 – 81]	
	Santo António	3	0	0% [0 – 56]	
	São Gonçalo	2	0	0% [0 – 66]	
	São Pedro	3	0	0% [0 – 56]	
Sexo	Macho	18	5	28% [12 – 51]	$\chi^2=0$; g.l.=1; $p=1$
	Fêmea	19	5	26% [12 – 49]	
Raça	SRD	23	6	26% [13 – 46]	$\chi^2=0$; g.l.=1; $p=1$
	Raça pura	14	4	29% [12 – 55]	
Faixa etária	Em crescimento	3	1	33% [6 – 79]	$\chi^2=4,017$; g.l.=1; $p=0,260$
	Jovens Adultos	5	0	0% [0 – 43]	
	Adultos	18	4	22% [9 – 45]	
	Séniore	11	5	27% [15 – 43]	
Desparasitação externa em dia?	Sim	12	5	42% [19 – 68]	$\chi^2=0,083$; g.l.=1; $p=0,774$
	Não	17	5	29% [13 – 53]	
	Sem resposta	8	0	0% [0 – 32]	
Desparasitação interna em dia?	Sim	17	5	29% [13 – 53]	$\chi^2=0$; g.l.=1; $p=1$
	Não	16	4	25% [10 – 49]	
	Sem resposta	4	1	25% [4,6 – 69,9]	
Co-habitação intra-espécie	Sim	30	9	30% [17 – 48]	$\chi^2=0,028$; g.l.=1; $p=0,868$
	Não	6	1	17% [3 – 56]	
	Sem resposta	1	0	0% [0 – 79]	
Co-habitação interespecie	Sim	14	5	36% [16 – 61]	$\chi^2=0,218$; g.l.=1; $p=0,641$
	Não	22	5	23% [10 – 43]	
	Sem resposta	1	0	0% [0 – 79]	
Acesso a espaços públicos	Sim	6	2	33% [10 – 70]	$\chi^2=0$; g.l.=1; $p=1$
	Não	30	8	27% [14 – 44]	
	Sem resposta	1	0	0% [0 – 79]	
Tipo de Alimentação	Ração Comercial	8	1	12% [2 – 47]	$\chi^2=3,911$; g.l.=2; $p=0,142$
	Comida caseira	5	3	60% [23 – 88]	
	Mistura ração e comida caseira	22	5	23% [10 – 43]	
	Sem resposta	2	1	50% [9,5 – 90,6]	

10.10. ANEXO 10 – Distribuição das amostras sanguíneas e caracterização dos animais (n=59)

ID Animal	Data recolha	Grupo de origem	Local Recolha/ Freguesia residência	Grupo etário	Sexo	Porte	CC	Observação parasitas externos	Profilaxia endoparasitas (subst.ativa ou produto comercial e data aplicação)		Profilaxia ectoparasitas (subst.ativa ou produto comercial e data aplicação)
1	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
2	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Idoso	Macho	Médio	4	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
3	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	4	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
4	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
5	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	27/11/2015	?
6	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
7	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	2	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
8	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
9	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
10	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Fêmea	Grande	3	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
11	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
12	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Médio	2	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
13	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Grande	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
14	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Macho	Médio	2	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
15	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
16	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
17	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Pequeno	5	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
18	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
19	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	27/11/2015	?
20	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
21	23/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
22	16/12/2015	Cães com detentor	Santo António	Idoso	Macho	Grande	4	S/ P.E.	Não faz		Não faz
23	17/12/2015	Cães assoc./canil	SPAD	Jovem adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
24	17/12/2015	Cães assoc./canil	SPAD	Em crescimento	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
25	17/12/2015	Cães assoc./canil	SPAD	Jovem adulto	Fêmea	Médio	4	S/ P.E.	?	?	?

ID Animal	Data recolha	Grupo de origem	Local Recolha/ Freguesia residência	Grupo etário	Sexo	Porte	CC	Observação parasitas externos	Profilaxia endoparasitas (subst.ativa ou produto comercial e data aplicação)		Profilaxia ectoparasitas (subst.ativa ou produto comercial e data aplicação)
26	17/12/2015	Cães assoc./canil	SPAD	Jovem adulto	Macho	Pequeno	2	S/ P.E.	?	?	?
27	27/12/2015	Cães com detentor	Santa Maria Maior	Adulto	Macho	Médio	4	S/ P.E.	Não faz		Não faz
28	28/12/2015	Cães com detentor	Santo António	Idoso	Macho	Grande	3	S/ P.E.	Não faz		Não faz
29	27/12/2015	Cães com detentor	Santa Maria Maior	Adulto	Macho	Médio	2	S/ P.E.	Não faz		Não faz
30	17/12/2015	Cães assoc./canil	SPAD	Jovem adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	?	?	?
31	29/12/2015	Cães com detentor	Santa Maria Maior	Adulto	Macho	Grande*	5	Pulgas	?	?	?
32	17/12/2015	Cães assoc./canil	SPAD	Jovem adulto	Macho	Médio	3	S/ P.E.	?	?	?
33	29/12/2015	Cães com detentor	Santa Maria Maior	Adulto	Macho	Médio	3	Pulgas	?	?	?
34	30/12/2015	Cães com detentor	Santa Maria Maior	Idoso	Macho	Médio	3	Pulgas	Não faz		Não faz
35	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
36	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
37	30/12/2015	Cães com detentor	Santo António	Jovem adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Milbemax	01/11/2015	?
38	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
39	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Médio	2	S/ P.E.	Ivermectina	08/10/2015	?
40	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
41	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Grande	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
42	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Grande	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
43	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Fêmea	Grande	3	S/ P.E.	Ivermectina	27/11/2015	?
44	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Fêmea	Grande	4	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
45	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Macho	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
46	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
47	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Grande	4	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
48	30/12/2015	Cães com detentor	Santo António	Jovem adulto	Fêmea	Médio	4	S/ P.E.	Profender®	01/12/2015	Nexgard® 01/12/2015
49	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Macho	Grande	3	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?
50	30/12/2015	Cães com detentor	Santo António	Adulto	Fêmea	Grande*	4	S/ P.E.	Guardian® + Milbemax®	01/11/2015	?
51	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Grande	2	S/ P.E.	Ivermectina	28/10/2015	?

ID Animal	Data recolha	Grupo de origem	Local Recolha/ Freguesia residência	Grupo etário	Sexo	Porte	CC	Observação parasitas externos	Profilaxia endoparasitas (subst. activa ou produto comercial e data aplicação)	Profilaxia ectoparasitas (subst. activa ou produto comercial e data aplicação)
52	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina 28/10/2015	?
53	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina 28/10/2015	?
54	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Fêmea	Pequeno	4	S/ P.E.	Ivermectina 27/11/2015	?
55	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Fêmea	Grande	4	S/ P.E.	Ivermectina 27/11/2015	?
56	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Fêmea	Médio	4	S/ P.E.	Ivermectina 28/10/2015	?
57	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Jovem adulto	Fêmea	Médio	3	S/ P.E.	Ivermectina 27/11/2015	?
58	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Grande	3	S/ P.E.	Ivermectina 23/10/2015	?
59	29/12/2015	Cães assoc./canil	CVG	Adulto	Macho	Pequeno	3	S/ P.E.	Ivermectina 28/10/2015	?

Legenda: Cães assoc./canil – Cães residentes em associações/canis
 CVG – Canil do Vasco Gil, situado na freguesia de Santo António
 SPAD – Sociedade Portuguesa dos Animais Domésticos, situada na freguesia de Santa Luzia
 S/ P.E. – Sem parasitas externos
 ? – Não conseguimos apurar os hábitos de profilaxia
 CC – Condição Corporal (avaliada na escala de 1 a 5)
 *únicos cães deste estudo de raça pura (Labrador Retriever)

10.11. ANEXO 11 - Resultados obtidos nas amostras sanguíneas através das técnicas morfológicas e serológicas (n=59)

ID Animal	Grupo de origem	Local de recolha	Técnica de Knott	Obs.	Esfregaço Sanguíneo	IFI Ac anti- <i>Babesia canis</i>	IFI Ac anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	IFI Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	IFI Ac anti- <i>Ehrlichia canis</i>
1	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Anaplasma phagocytophilum</i> e <i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	+	Neg.	+	Neg.
3	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
4	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	+	Neg.	Neg.	Neg.
6	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
7	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
8	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
9	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
10	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	+	+	+	Neg.
11	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
12	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	+	Neg.	Neg.	Neg.
13	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	+	Neg.	Neg.
14	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp	Neg.	Neg.	+	Neg.
15	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.
16	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
17	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.
18	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.
19	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
20	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
21	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
22	Cães c/ detentor	Santo António	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
23	Cães assoc./canil	SPAD	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	+	Neg.	Neg.	Neg.
24	Cães assoc./canil	SPAD	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
25	Cães assoc./canil	SPAD	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp	Neg.	Neg.	+	Neg.

ID Animal	Grupo de origem	Local de recolha	Técnica de Knott	Obs.	Esfregaço Sanguíneo	IFI Ac anti- <i>Babesia canis</i>	IFI Ac anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	IFI Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	IFI Ac anti- <i>Ehrlichia canis</i>
26	Cães assoc./canil	SPAD	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	+	+	+
27	Cães c/ detentor	Santa Maria Maior	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
28	Cães c/ detentor	Santo António	Neg.	Positivo no teste rápido Uranotest® Dirofilaria aquando recolha Vetmedis	<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
29	Cães c/ detentor	Santa Maria Maior	Microfilárias de <i>Dirofilaria immitis</i>	Positivo no teste rápido Witness® Dirofilaria	Microfilárias	Neg.	Neg.	+	Neg.
30	Cães assoc./canil	SPAD	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp	+	+	+	+
31	Cães c/ detentor	Santa Maria Maior	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
32	Cães assoc./canil	SPAD	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
33	Cães c/ detentor	Santa Maria Maior	Neg.		Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.
34	Cães c/ detentor	Santa Maria Maior	Neg.		Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.
35	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
36	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Anaplasma phagocytophilum</i> e <i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
37	Cães c/ detentor	Santo António	Neg.		Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.
38	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
39	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	+
40	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
41	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
42	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
43	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
44	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
45	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

ID Animal	Grupo de origem	Local de recolha	Técnica de Knott	Obs.	Esfregaço Sanguíneo	IFI Ac anti- <i>Babesia canis</i>	IFI Ac anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	IFI Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	IFI Ac anti- <i>Ehrlichia canis</i>
46	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	+	Neg.
47	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
48	Cães c/ detentor	Santo António	Neg.	Positivo no teste rápido Uranotest® Dirofilaria aquando recolha Vetmedis	<i>Mycoplasma</i> spp.	Não foi feito	Neg.	Neg.	Neg.
49	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
50	Cães c/ detentor	Santo António	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
51	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Não foi feito	Neg.	Neg.	Neg.
52	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
53	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Mycoplasma</i> spp.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
54	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
55	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	+	Neg.	+	Neg.
56	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	+	Neg.	+	Neg.
57	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	+	Neg.	Neg.
58	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.
59	Cães assoc./canil	CVG	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.

Legenda: Cães assoc./canil – Cães residentes em associações/canis
CVG – Canil do Vasco Gil, situado na freguesia de Santo António
SPAD – Sociedade Portuguesa dos Animais Domésticos, situada na freguesia de Santa Luzia

10.12. ANEXO 12 – Distribuição das infecções parasitárias hemáticas por grupo de origem e local de recolha (n=59)

Resultado parasitário		Cães residentes em associações/canis		Cães com detentor (n)	Total (n)
		SPAD (n)	CVG (n)		
Negativo		1	9	0	10
Infecções simples	Observação <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0	1	0	1
	Observação <i>Mycoplasma</i> spp.	0	3	1	4
	Ac anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0	2	0	2
	Ac anti- <i>Babesia canis</i>	0	3	3	6
	Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	1	8	2	11
Co-infecções	Ac anti- <i>Babesia canis</i> + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	0	2	0	2
	Ac anti- <i>Ehrlichia canis</i> + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	0	1	0	1
	Ac anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> + Ac anti- <i>Babesia canis</i> + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	0	1	0	1
	Observação <i>Anaplasma phagocytophilum</i> + <i>Mycoplasma</i> spp.	0	1	0	1
	Observação <i>Anaplasma phagocytophilum</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	0	1	0	1
	Observação <i>Anaplasma phagocytophilum</i> + Ac anti- <i>Babesia canis</i>	0	1	0	1
	Observação <i>Anaplasma phagocytophilum</i> + Ac anti- <i>Babesia canis</i> + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	0	1	0	1
	Observação <i>Mycoplasma</i> spp. + Ac anti- <i>Babesia canis</i>	1	1	0	2
	Observação <i>Mycoplasma</i> spp. + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	1	8	3	12
	Observação <i>Mycoplasma</i> spp. + Ac anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> + Ac anti- <i>Ehrlichia canis</i> + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	1	0	0	1
	Observação <i>Mycoplasma</i> spp. + Ac anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> + Ac anti- <i>Babesia canis</i> + Ac anti- <i>Ehrlichia canis</i> + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	1	0	0	1
	Observação de microfilárias + Ac anti- <i>Rickettsia conorii</i>	0	0	1	1
Total		6	43	10	59

10.13. ANEXO 13 – Associações estatísticas entre as características observadas e os resultados de hemoparasitas detectados (n=59)

Factor		Nº total de amostras (n)	Nº de amostras positivas (n) (parasitas observados ao MOC)	Associação estatística	Nº de amostras seropositivas (Ac detectados por IFI)	Associação estatística
Freguesia	Santo António	48	20	$\chi^2 = 1,389$;	33	$\chi^2 = 2,607$;
	Santa Maria Maior	5	2	g.l.=2 ;	5	g.l.=2;
	Santa Luzia	6	4	$p=0,499$	5	$p=0,272$
Sexo	Macho	33	13	$\chi^2 = 0,303$;	27	$\chi^2 = 2,087$;
	Fêmea	26	13	g.l.=1 ; $p=0,582$	16	g.l.=1; $p= 0,149$
Raça	SRD	57	25	$\chi^2 = 0$;	41	$\chi^2 = 0,005$;
	Raça pura	2	1	g.l.=1; $p=1$	2	g.l.=1; $p= 0,945$
Porte	Pequeno	15	6	$\chi^2 = 0,708$;	11	$\chi^2 = 0,611$;
	Médio	29	12	g.l.=2 ;	20	g.l.=2;
	Grande	15	8	$p=0,702$	12	$p=0,737$
Grupo etário	Em crescimento	1	0	$\chi^2 = 3,891$; g.l.=3 ; $p=0,274$	1	$\chi^2 = 2,079$; g.l.=3; $p=0,556$
	Jovens Adultos	18	11		13	
	Adultos	36	13		25	
	Sêniores	4	2		4	
Observou-se ectoparasitas?	Sim	3	1	$\chi^2 = 0$;	3	$\chi^2 = 0,175$;
	Não	56	25	g.l.= 1 ; $p= 1$	40	g.l.=1; $p=0,676$
Profilaxia contra endoparasitas	Sim	48	19	$\chi^2 = 0,164$;	33	$\chi^2 = 0,911$;
	Não	5	3	g.l.=1 ; $p= 0,686$	5	g.l.=1; $p=0,339$
	Sem resposta	6	4		5	